

**Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Mikrobiologie



Bc. Jan Kolek

Biosyntéza spodních polyketidových řetězců manumycinových antibiotik – faktory
ovlivňující jejich délku

Biosynthesis of lower polyketide chains in manumycin antibiotics – the length-affecting
factors

Diplomová práce

Školitel: Ing. Miroslav Petříček, CSc.

Praha, 2013

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 3.5.2013

Podpis:

Poděkování:

Poděkování patří mému školiteli Ing. Miroslavu Petříčkovi, CSc. za vlídné přijetí, trpělivost, velkou pomoc při zpracování této práce a mnohé cenné rady.

Mgr. Kateřině Petříčkové, PhD. za přátelský přístup, pomoc v laboratorní praxi a mnohé cenné rady.

Mé matce Evě Kolkové za dlouholetou podporu při studiu i v životě.

Mé přítelkyni Kristýně Hofmanové za podporu při studiu i v životě a všem výše uvedeným upřímně a srdečně

Děkuji.

Tato práce byla podporována grantovými projekty IGA MZČR NT13012-4/2012 a NPVII MŠČR ZB06154.

Abstrakt:

Manumycinová antibiotika jsou významnou skupinou sekundárních metabolitů produkovaných bakteriemi rodu *Streptomyces*. Patří do velké skupiny polyketidových látek a vykazují významné antimikrobiální, protizánětlivé, protinádorové a mnohé další biologické aktivity. Jsou charakterizována dvěma krátkými lineárními polyketidovými řetězci, které jsou připojené k centrální podjednotce. Polyketidové řetězce jsou syntetizovány enzymy iterativní polyketid-syntázy typu II. U manumycinových antibiotik prozatím nebyl popsán způsob regulace délky syntetizovaných krátkých polyketidových řetězců. Dokonalé pochopení mechanismu této regulace by bylo využitelné k následné syntéze manumycinových antibiotik s přesně definovanou délkou řetězců, které by mohly vykazovat lepší biologické účinky využitelné v praxi. K identifikaci faktoru zodpovědného za regulaci délky spodního řetězce u manumycinových antibiotik byl vytvořen mutantní kmen producenta asukamycinu *Streptomyces nodosus* ssp. *asukaensis* s deletovanými geny pro β -ketoacylsyntázu typu I/II a pro protein AsuC14, který by mohl být potenciálním faktorem určujícím délku spodního řetězce. Následně byly v tomto mutantním kmenu exprimovány geny pro β -ketoacylsyntázu typu I/II a potenciální faktor ovlivňující délku řetězce C14 z jiných producentů manumycinových antibiotik, která mají stejnou nebo rozdílnou délku spodního řetězce. Výsledky potvrdily, že protein C14 je skutečně faktorem zodpovědným za délku syntetizovaného spodního polyketidového řetězce u manumycinových antibiotik. Jedná se o zcela nový typ faktoru určujícího délku, který prozatím nebyl popsán u žádných jiných polyketidů syntetizovaných polyketid-syntázou typu II.

Klíčová slova: asukamycin, manumycin, polyketidy, biosyntéza, sekundární metabolity, streptomycety, délka polyketidových řetězců

Abstract:

Manumycin antibiotics represent an important class of secondary metabolites produced by *Streptomyces* bacteria. They belong to a big class of polyketide metabolites and possess significant antimicrobial, anti-inflammatory, antitumor, and many other biological activities. They are characterized by two short polyketide chains, which are attached to a central subunit. Polyketide chains are synthesized by enzymes of the iterative type II polyketide-synthase. Mechanism of regulation of the polyketide chains length has not been known yet. Understanding mechanism can lead to biosynthesis of novel manumycin antibiotics with predetermined chain lengths what may improve their biological activities in favour of a practical use of these compounds. We prepared a mutant strain of asukamycin producer *Streptomyces nodosus* ssp. *asukaensis* with deletion of genes coding for type I/II β -ketoacylsynthase and protein AsuC14, which is a potential factor affecting lower polyketide chain length, for the identification of the chain length factor in manumycin antibiotics producers. Next, the genes for type I/II β -ketoacylsynthase and potential chain length-affecting factor C14 from strains producing manumycins with variable length of the lower polyketide chains were expressed in this mutant strain. Our results demonstrate that protein C14 really acts as the chain length-affecting factor. It represents a new type of chain length factor that has not been described in any other type II polyketide-synthase biosynthesised compounds yet.

Keywords: asukamycin, manumycin, polyketides, biosynthesis, secondary metabolites, streptomycetes, polyketide chain length

Obsah

Obsah	4
Seznam zkratek	5
1. Úvod	6
2. Přehled literatury	8
2.1. Manumycinová antibiotika	8
2.1.1 Producenti manumycinových antibiotik – bakterie rodu <i>Streptomyces</i>	8
2.1.2 Skupina manumycinových antibiotik.....	9
2.1.3 Struktura manumycinových antibiotik.....	10
2.1.4 Biologická aktivita manumycinových antibiotik.....	12
2.2 Biosyntéza polyketidových látek	14
2.2.1 Podobnost a rozdíly mezi biosyntézou polyketidů a mastných kyselin.....	14
2.2.2 Rozdělení PKS.....	16
2.2.3 Minimální PKS.....	17
2.2.4 Možnosti iniciace polyketidové syntézy.....	17
2.2.5 Regulace délky vznikajících polyketidových řetězců.....	19
2.2.6 Biosyntéza manumycinových látek.....	24
2.3 Možnosti úprav manumycinových antibiotik	28
3. Materiál a metody	29
3.1. Materiál	29
3.1.1 Bakteriální kmeny.....	29
3.1.2 Vektory.....	30
3.1.3 DNA vzorky a próby.....	33
3.1.4 Kultivační média.....	33
3.1.5 Roztoky přidávané do médií.....	36
3.1.6 DNA oligonukleotidy a velikostní standardy.....	36
3.1.7 Protilátky a enzymy.....	37
3.1.8 Pufry a roztoky.....	38
3.2 Metody	43
3.2.1 Metody izolace DNA.....	43
3.2.2 Metody další práce s DNA.....	46
3.2.3 Metody transformace buněk plasmidovou DNA.....	51
3.2.4 Metody výměny genů ve streptomycetách.....	53
3.2.5 Separční a analytické metody.....	54
4. Výsledky	58
4.1. Příprava mutantního kmenu <i>Streptomyces nodosus</i> ssp. <i>asukaensis</i> Δ <i>asuC13–C14</i>	58
4.1.1 Izolace plasmidu pMQ06 a vytvoření delece v oblasti genů <i>asuC13–C14</i>	58
4.1.2 Příprava plasmidu pPMQ.....	58
4.1.3 Homologní rekombinace ve <i>Streptomyces nodosus</i> ssp. <i>asukaensis</i> (<i>asuC13</i> :: <i>apr</i> ^R).....	60
4.1.4 Ověření správnosti proběhlé homologní rekombinace.....	60
4.2 Komplementace delece genů <i>asuC13–C14</i> a analýza produkovaných sekundárních metabolitů	64
4.2.1 Transformace mutantního kmenu <i>Streptomyces nodosus</i> ssp. <i>asukaensis</i> Δ <i>asuC13–C14</i> sadou plasmidů pro komplementaci delece.....	64
4.2.2 Extrakce a analýza sekundárních metabolitů v transformovaných buňkách.....	65
5. Diskuze	71
6. Souhrn	75
7. Seznam použité literatury	76

Seznam zkratek

3,4-AHBA	kyselina 3-amino-4-hydroxybenzoová
3,5-AHBA	kyselina 3-amino-5-hydroxybenzoová
5-ALA	kyselina 5-aminolevulová
A ₂₆₀	absorbance při vlnové délce 260 nm
A ₂₈₀	absorbance při vlnové délce 280 nm
ACP	„ <u>A</u> cy <u>C</u> arrier- <u>P</u> rotein“
ActCLF	„ <u>C</u> hain- <u>L</u> ength- <u>F</u> actor“ podílející se na biosyntéze actinorhodinu
ActKS	β-ketoacylsyntáza podílející se na biosyntéze actinorhodinu
ActKS/CLF	heterodimer β-ketoacylsyntáza/„ <u>C</u> hain- <u>L</u> ength- <u>F</u> actor“ podílející se na biosyntéze actinorhodinu
ActPKS	polyketid-syntáza podílející se na biosyntéze actinorhodinu
APP	„ <u>A</u> myloid <u>P</u> recursor <u>P</u> rotein“
Apr	apramycin
ArCP	„ <u>A</u> ryl- <u>C</u> arrier-protein“
ASA	l-aspartát-4-semialdehyd
BACE1	„ <u>B</u> eta- <u>S</u> ecretase <u>1</u> “
BenPKS	polyketid-syntáza podílející se na biosyntéze benastatinu
bp	páry bazí („ <u>B</u> ase <u>P</u> air“)
BSA	bovinní sérový albumin
DEBS-PKS	„ <u>6</u> - <u>D</u> eoxyerythronolid <u>B</u> <u>S</u> ynthase- <u>P</u> KS“
DH	dehydratáza
dH ₂ O	destilovaná voda
DHA	dihydroxyaceton
DHAP	dihydroxyacetonfosfát
Dig-dUTP	digoxigeninem značené dUTP
DMSO	dimetylsulfoxid
DTT	dithiotritol
EDTA	kyselina etylendiamintetraoctová
ER	enoylreduktáza
FAS (I, II)	syntáza mastných kyselin (typu I, II)
FdmCLF	„ <u>C</u> hain- <u>L</u> ength- <u>F</u> actor“ podílející se na biosyntéze fredericamycinu
FdmPKS	polyketid-syntáza podílející se na biosyntéze fredericamycinu
GraCLF	„ <u>C</u> hain- <u>L</u> ength- <u>F</u> actor“ podílející se na biosyntéze granaticinu
GraPKS	polyketid-syntáza podílející se na biosyntéze granaticinu
GrhCLF	„ <u>C</u> hain- <u>L</u> ength- <u>F</u> actor“ podílející se na biosyntéze griseorhodinu B
CHC-CoA	cyklohexylcarbonyl-CoA
IKK	„ <u>I</u> - <u>κ</u> <u>B</u> - <u>K</u> inase“
IPTG	izopropyl-β-D-1-thiogalactopyranozid
IU	„ <u>I</u> ntensity <u>U</u> nits“
KR	ketoreduktáza
KS (I, II, I/II, III)	β-ketoacylsyntáza (typu I, II, I nebo II, III)
MAT	malonyl-CoA:ACP-transacyláza
Mbp	milióny párů bazí („ <u>M</u> ega <u>B</u> ase <u>P</u> air“)
MCS	mnohočetné klonovací místo („ <u>M</u> ultiple <u>C</u> loning <u>S</u> ite“)
OD ₆₀₀	optická denzita při vlnové délce 600 nm
PEG 1000	polyetylen glykol o molekulové váze 1000 g . mol ⁻¹
PKS (I, II, III)	polyketid-syntáza (typu I, II, III)
ROS	reaktivní formy kyslíku („ <u>R</u> eactive <u>O</u> xygen <u>S</u> pecies“)
rpm	počet otáček za minutu („ <u>R</u> otation <u>P</u> er <u>M</u> inute“)
SDS	dodecylsírán sodný
TcmCLF	„ <u>C</u> hain- <u>L</u> ength- <u>F</u> actor“ podílející se na biosyntéze tetracenomycinu
TcmKS	β-ketoacylsyntáza podílející se na biosyntéze tetracenomycinu
TE	thioesteráza
TES	kyselina N-tris(hydroxymetyl)metyl-2-aminoetansulfonová
TLC	chromatografie na tenké vrstvě („ <u>T</u> hin <u>L</u> ayer <u>C</u> hromatography“)
TNF-α	„ <u>T</u> umor <u>N</u> ecrosis <u>F</u> actor <u>α</u> “
TRIS	Tris(hydroxymetyl)aminometan
UHPLC-DAD	ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie s detekcí diodového pole
UHPLC-ToFMS	ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí
WhiCLF	„ <u>C</u> hain- <u>L</u> ength- <u>F</u> actor“ podílející se na biosyntéze whiE sporového pigmentu
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranozid
ZhuCLF	„ <u>C</u> hain- <u>L</u> ength- <u>F</u> actor“ podílející se na biosyntéze R1128
ZhuPKS	polyketid-syntáza podílející se na biosyntéze R1128

1. Úvod

V živých organismech rozlišujeme dva základní druhy metabolismu. Primární metabolismus zahrnuje všechny děje potřebné k samotnému přežití a reprodukci (metabolismus cukrů, tuků, nukleových kyselin, aminokyselin atd.). V sekundárním metabolismu potom vznikají látky, které zpravidla nejsou nezbytné pro samotné přežití organismu. Poskytují mu však často selekční výhodu oproti ostatním konkurentům v okolí či možnost přežití v nehostinných podmínkách. Typickými producenty sekundárních metabolitů jsou především prokaryotické organismy, dále také houby a některé rostliny. Často vznikají jedinečnými syntetickými drahami, které jsou unikátní pouze pro jeden druh či skupinu organismů. Na rozdíl od primárního metabolismu dochází k syntéze sekundárních metabolitů pouze v určité fázi buněčného cyklu. U bakterií se jedná typicky o přechod do stacionární fáze růstu, kdy dochází k poklesu živin v prostředí nebo o stresové situace. Sekundárními metabolity jsou např. toxiny, autoregulační faktory, enzymy pro utilizaci neobvyklých substrátů nebo antibiotika.

Jednou z velkých skupin sekundárních metabolitů jsou polyketidové látky. Do této skupiny patří některá klinicky významná antibiotika, jako jsou makrolidy nebo tetracykliny. Dále např. klinicky používané imunosupresivum rapamycin nebo protinádorová látka doxorubicin. Všechny polyketidy jsou syntetizovány enzymatickými systémy, které se nazývají polyketid-syntázy. Samotný průběh polyketidové syntézy se v mnohém podobá syntéze mastných kyselin. Principem vzniku polyketidů i mastných kyselin je postupná kondenzace acyl-CoA substrátů, které tak postupně tvoří delší řetězce a jsou dále různě upravovány. Relativně malou skupinou v rámci polyketidových látek jsou manumycinová antibiotika. Jedná se o skupinu látek, které mají podobnou strukturu zahrnující dva krátké polyketidové řetězce. Manumyciny jsou studovány hlavně pro jejich potenciálně využitelné biologické účinky. Nejvýznamnější je jejich protinádorová, antibiotická a protizánětlivá aktivita. V poslední době je také intenzivně studováno jejich možné využití v léčbě Alzheimerovy choroby.

Lineární polyketidové řetězce manumycinových antibiotik (označené jako horní a spodní) jsou hlavní strukturou, ve které se od sebe jednotlivé manumyciny odlišují. Stejně tak jsou často strukturou, která je přímo zodpovědná za jejich biologickou aktivitu (např. struktura horního řetězce určuje míru vykazovaných protinádorových aktivit). Přesný způsob, jakým dochází v produkčních organismech k biosyntéze těchto krátkých řetězců, prozatím nebyl zcela vyjasněn. U producenta asukamycinu byl jako u prozatím jediného zástupce popsán celý genový shluk zodpovědný za jeho biosyntézu. V něm bylo identifikováno několik genů, které se podílejí na biosyntéze polyketidových řetězců. Jedním z hlavních enzymů pro biosyntézu spodního řetězce je β -ketoacylsyntáza typu I/II AsuC13 (Rui *et al.* 2010). Velmi podobný enzym se podílí na biosyntéze různých aromatických bakteriálních polyketidů, jako je např. actinorhodin nebo tetracenomycin (Malpartida & Hopwood 1986, Motamedi & Hutchinson 1987). β -ketoacylsyntáza v těchto případech tvoří funkční heterodimer spolu s tzv. chain-length-factorem (CLF), což je protein vysoce homologní s funkční β -ketoacylsyntázou. Ve své aminokyselinové sekvenci tyto proteiny postrádají aktivní jádro a další úseky. CLF určuje finální délku syntetizovaného řetězce (McDaniel *et al.* 1993, Keatinge-Clay *et al.* 2004). Konkrétně u aromatických bakteriálních polyketidů je rozmezí délky syntetizovaných řetězců mezi hexaketidem (během biosyntézy proběhne celkem 6 kondenzací acyl-CoA jednotek) až pentadekaketidem (patnáct kondenzací). V genovém shluku asukamycinu byl popsán gen kódující protein AsuC14, který je velmi podobný sekvenci AsuC13 a zároveň také postrádá aktivní jádro i další části sekvence na N-konci. Při porovnání s dosud popsanými CLF proteiny aromatických bakteriálních polyketidů s nimi AsuC14 v některých oblastech sdílí stejné konzervované sekvence. Na druhou stranu,

v mnoha oblastech tyto konzervované sekvence postrádá. Délka spodního řetězce u manumycinových antibiotik byla popsána v rozmezí diketidu až tetraketidu. Teoreticky by se tedy v případě *AsuC14* mohlo jednat o zcela novou rodinu CLF proteinů, která nebyla dosud nikde popsána a účastní se výhradně regulace délky kratších polyketidových řetězců.

Délka polyketidových řetězců je jedním z hlavních faktorů určujících finální strukturu látky. Dokonalé pochopení biosyntetických drah manumycinových antibiotik by bylo možné v budoucnu využít k cíleným modifikacím manumycinových molekul. Ty by mohly vést např. ke zvýšení biologických aktivit, vylepšení fyzikálně-chemických vlastností (např. rozpustnost) či ke snížení jejich toxicity. Takto modifikované manumycinové látky by se v budoucnu mohly stát klinicky používanými preparáty v humánní medicíně.

Cíle diplomové práce:

- Potvrdit, zda je produkt genu *asuC14* esenciální pro biosyntézu asukamycinu.
- Otestovat, zda jsou geny *asuC13* a *asuC14* nahraditelné homologními geny z producentů colabomycinu E a manumycinu A.
- Potvrdit, zda je produkt genu *C14* u producentů asukamycinu, manumycinu A a colabomycinu E faktorem regulujícím délku spodního polyketidového řetězce.
- Připravit nové manumycinové antibiotikum – „asukamycin-tetraen“.

2. Přehled literatury

2.1. Manumycinová antibiotika

2.1.1 Producenti manumycinových antibiotik – bakterie rodu *Streptomyces*

Manumycinová antibiotika jsou produkována některými druhy bakterií rodu *Streptomyces*. Streptomycety obecně patří mezi nejvýznamnější producenty biologicky aktivních látek v přírodě. Z jejich sekundárního metabolismu pochází asi 70% všech známých antibiotik. Řada z nich má klinické uplatnění v humánní medicíně či zvěrolékařství (např. streptomycin – *Streptomyces griseus*, oxytetracyklin – *Streptomyces rimosus*, chloramfenikol – *Streptomyces venezuelae* atd.). Kromě antibiotik jsou také producenty protinádorových preparátů, antimykotik, imunopresantů a dalších látek s nejrůznějšími biologickými účinky.

Celý rod *Streptomyces* je řazen do velkého řádu *Actinomycetales*, kam patří také např. významné bakteriální rody *Corynebacterium* a *Mycobacterium*. Jedná se o gram-pozitivní, striktně aerobní organismy. Jejich životním prostředím je nejčastěji půda. Existuje však také mnoho izolátů z jiných prostředí (sladké i oceánické vody, povrchy těl živočichů a rostlin atd.). V půdě se díky svému bohatému sekundárnímu metabolismu často významně podílejí na dekompozici organického materiálu, a tím i na koloběhu uhlíku v přírodě. Mnohé druhy jsou schopné z půdního prostředí enzymaticky odbourávat škodlivé polutanty, jako jsou např. ropné produkty, fenolické látky atd. Tyto druhy jsou potenciálně využitelné pro cílené remediace půd.

Životní cyklus streptomycet je velmi komplexní. Buňky během něj prochází složitou diferenciací. Mají schopnost tvořit exospor, které jsou méně odolné, než např. endospor bakterii rodu *Bacillus* nebo *Clostridium*, ale i tak mohou buňku chránit v často nehostinném půdním prostředí. Především se jedná o ochranu proti vysychání. Pokud se exospora dostane do vhodného prostředí, rychle vyklíčí v tzv. substrátové mycelium, které později přechází do fáze vzdušného mycelia, na jehož koncích se opětovně začínají oddělovat jednotlivé spory (Ohnishi *et al.* 2002).

Genom streptomycet je v porovnání s ostatními bakteriemi mimořádně velký. Čítá zpravidla 6–10 Mbp (u modelové bakterie *Escherichia coli* je velikost genomu asi 4,5–6 Mbp). Zastoupení GC párů v genomu je okolo 70 %, což je mimořádně vysoký poměr (u *E. coli* je to 50 %). Nositelům genetické informace je lineární chromozóm a případně přídatné lineární nebo cirkulární plasmidy (Bentley *et al.* 2002). Geny na chromozómu jsou uspořádány do tzv. centrální oblasti a dvou oblastí ramen. Centrální oblast je mezi různými druhy poměrně konzervovaná. Nacházejí se v ní hlavně geny zapojené v primárním metabolismu a dalších esenciálních buněčných pochodech (Ikeda *et al.* 2003, Choulet *et al.* 2006, Ohnishi *et al.* 2008). Oblast ramen je potom většinou nositelem rozdílů mezi jednotlivými druhy a kmeny. Zde jsou soustředěny především neesenciální geny pro sekundární metabolismus (Dary *et al.* 2000, Choulet *et al.* 2006).

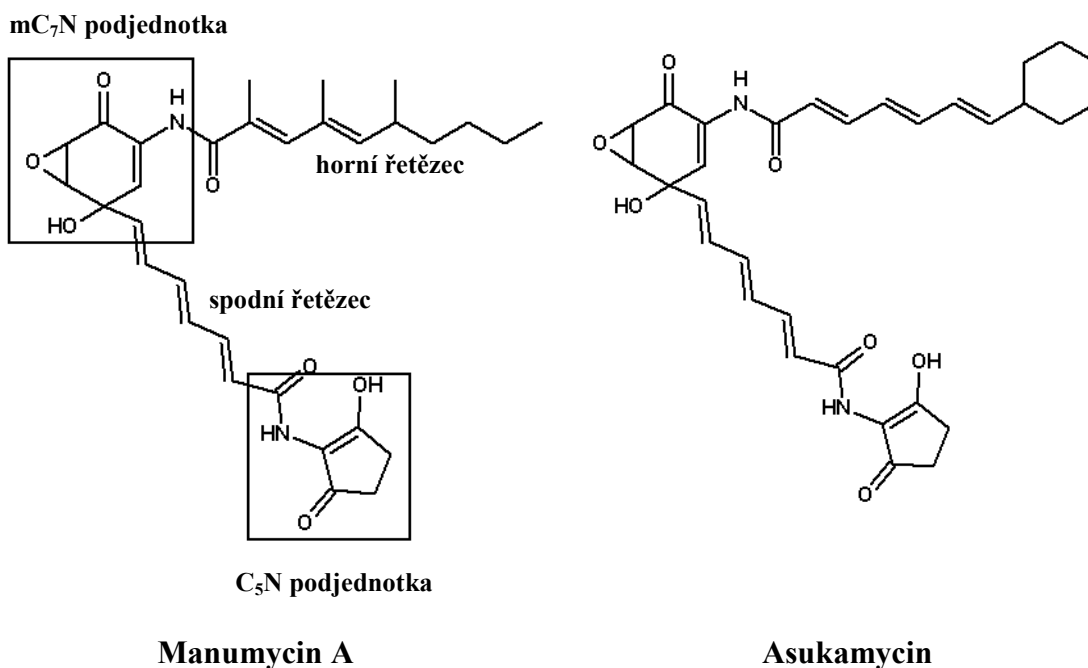
Pro svůj složitý buněčný cyklus a diferenciaci se streptomycety staly důležitým modelovým organismem pro výzkum buněčných regulací. Díky významnosti tohoto bakteriálního rodu byly dobře propracovány metody pro jejich genetickou manipulaci (Kieser *et al.* 2000). Stejně tak je pro tento rod k dispozici velké množství sekvenačních dat. V genomových databázích lze vyhledat 12 kompletních genomů streptomycet a velké množství neúplných sekvenačních projektů

(zdroj: databáze GOLD – <http://www.genomesonline.org/cgi-bin/GOLD/index.cgi>).

2.1.2 Skupina manumycinových antibiotik

Dle způsobu biosyntézy a chemické struktury se manumycinová antibiotika řadí do obrovské skupiny polyketidových látek. Tedy látek, v jejichž biosyntéze se uplatňuje polyketidová syntéza katalyzovaná systémy polyketid-syntáz (PKS) (viz. kapitola 2.2.1). Polyketidy se dále rozdělují na větší či menší skupiny. Z významných antibiotických skupin sem patří např. tetracykliny (chlortetracyklin, oxytetracyklin), makrolidy (erytromycin), polyetery (monensin) a mnoho dalších. Kromě antibiotik sem patří i další biologicky aktivní, v praxi používané látky, jako je třeba protinádorová látka doxorubicin nebo imunosupresivum rapamycin. Poměrně malou podskupinu tvoří manumycinová antibiotika. Ta byla pojmenována podle prvního objeveného zástupce manumycinu A (Obr. 1) a jeho popsáných antibiotických účinků. Jedná se o množinu látek, které se navzájem podobají strukturou svojí molekuly i svými chemickými a biologickými vlastnostmi.

Dodnes bylo popsáno okolo čtyřiceti zástupců manumycinových látek. Manumycin A byl poprvé izolován z producenta *Streptomyces parvulus* Tü64 v roce 1963 z půdního vzorku pocházejícího z okolí Manchesteru ve Velké Británii (Buzzetti *et al.* 1963). V roce 1976 byl objeven další důležitý zástupce, asukamycin (Obr. 1) z producenta *Streptomyces nodosus* ssp. *asukaensis* (Omura *et al.* 1976). Velké množství manumycinových metabolitů bylo objeveno v osmdesátých a devadesátých letech 20. století. Všechny tyto izoláty pocházely z přírodních bakteriálních kmenů a byly objeveny zpravidla při cíleném vyhledávání nových antimikrobiálních látek. Tento trend pokračuje i v současnosti. Navíc se objevují látky, které jsou uměle připraveny pomocí metod klasického genového inženýrství, kombinatorní biosyntézy či cíleného podsouvání nestandardních prekurzorů přírodním i upraveným bakteriálním producentům (viz. kapitola 2.3).



Obr. 1: Struktura manumycinu A a asukamycinu. Poloha mC₇N podjednotky, C₅N podjednotky a polyketidových řetězců. Převzato z Zeec *et al.* (1987) a Omura *et al.* (1976).

2.1.3 Struktura manumycinových antibiotik

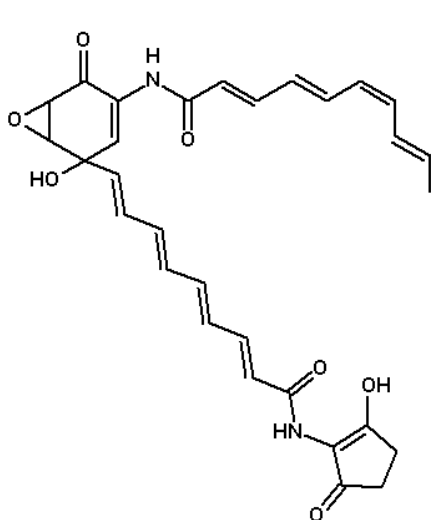
Každá látka ze skupiny manumycinových antibiotik se skládá ze základní, tzv. mC_7N , podjednotky a ze dvou krátkých, lineárních polyketidových řetězců, které jsou označovány jako horní a spodní. Většina manumycinů má spodní řetězec zakončený tzv. C_5N podjednotkou. Podle způsobu biosyntézy může nést molekula ještě další specifické struktury, jako např. cyklohexanový kruh na konci horního řetězce asukamycinu (Obr. 1).

Základní mC_7N podjednotka je nejvíce konzervovanou strukturou manumycinových antibiotik. Chemicky se jedná se o 2-amino-4-hydroxy-5,6-epoxy-cyklohex-2-enon. Tato struktura je u všech manumycinů v podstatě totožná. Může se lišit pouze mírně dle přítomnosti skupiny vázané na uhlíku C_5 a C_6 . Touto rozdílností se manumyciny rozdělují do skupin I a II. Manumyciny typu I nesou v pozici $C_5/6$ epoxydovou skupinu (Obr. 1, 2). Manumyciny typu II postrádají epoxyd a nesou pouze hydroxylovou skupinu v pozici C_5 (Obr. 2) (Sattler *et al.* 1998). V nedávné době byly objeveny zcela nové manumycinové látky nazvané chinikomyciny. Jejich mC_7N podjednotka se v mnohém odlišuje od ostatních manumycinů. Chinikomycin A nese přímo na mC_7N podjednotku navázaný atom chloru v pozici C_6 a spodní řetězec vázaný v pozici C_5 (Obr. 3) (Li *et al.* 2005). Všechny ostatní dosud známé manumyciny mají spodní řetězec vázaný k mC_7N podjednotce v pozici C_4 .

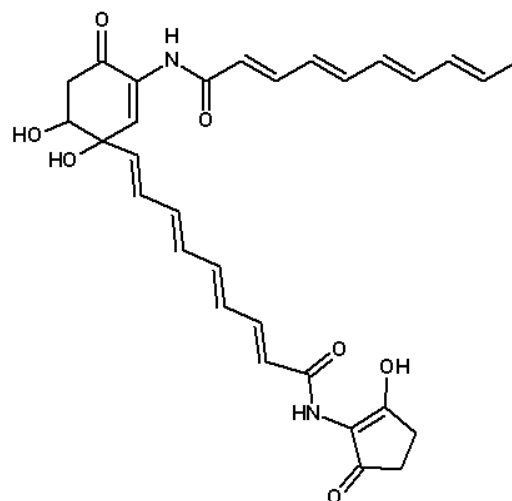
Druhou nejvíce konzervovanou skupinou, která však není nutně zastoupena u všech manumycinů, je C_5N podjednotka (2-amino-3-hydroxycyclopentenon). Pokud spodní polyketidový řetězec není zakončen touto strukturou, zakončuje se pouze karboxylovou skupinou (např. U-62,162, nisamycin) (Obr. 3) (Slechta *et al.* 1982, Hayashi *et al.* 1993).

Spodní polyketidový řetězec nabývá nejčastěji podoby trans-trienového šestiuhlíkového řetězce (je syntetizován jako triketid, dochází tedy ke třem kondenzacím malonyl-CoA). Výjimkou jsou colabomyciny, ty mají řetězec tetraenový (osmiuhlíkový, syntetizovaný jako tetraketid) (Obr. 2) a izolát U-62,162, který má kratší čtyřuhlíkový řetězec (syntetizovaný jako diketid). Spodní řetězec látky U-62,162 je navíc kompletně satureovaný (Obr. 3) (Slechta *et al.* 1982, Grote *et al.* 1988a, Sattler *et al.* 1998).

Horní polyketidový řetězec je nejméně konzervovanou strukturou celé molekuly a může nabývat různých struktur. Mezi jednotlivými manumyciny se liší ve své délce, v množství a poloze dvojných vazeb, popř. svým rozvětvením a metylacemi. V závislosti na jeho biosyntéze může být zakončen nasycenou skupinou v rozmezí metylu až větveného hexanu. Kromě alifatických skupin může být zakončen i cyklickou skupinou (např. asukamycin). Známé manumyciny obsahují v horním řetězci jednu (např. manumycin B) až 5 (colabomycin E) dvojných vazeb. Dle struktury horního řetězce dále dělíme manumycinová antibiotika do skupin A a B (popř. C). Manumyciny skupiny A jsou takové, které mají lineární horní řetězec. Do skupiny B řadíme látky s větveným horním řetězcem. Speciální skupina C zahrnuje pouze látku U-62,162, která má satureovaný spodní řetězec. S použitím obou dělení se tedy manumycinové látky rozdělují celkem do pěti skupin. Jsou to skupiny IA (např. asukamycin, colabomycin A), IB (např. manumycin A), IIA (např. colabomycin D), IIB (např. manumycin D) a IC (U-62,162).

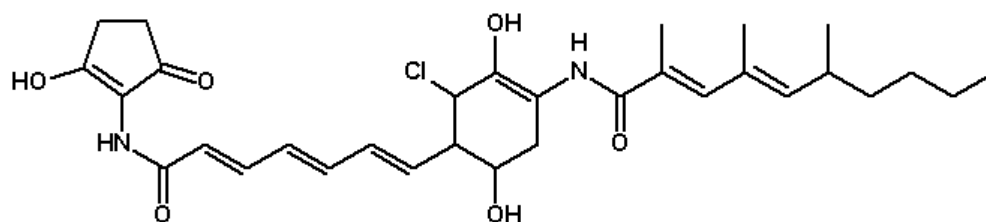


Colabomycin A

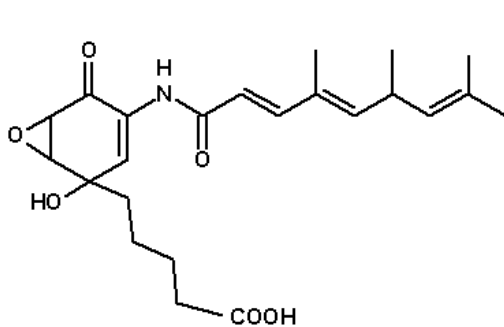


Colabomycin D

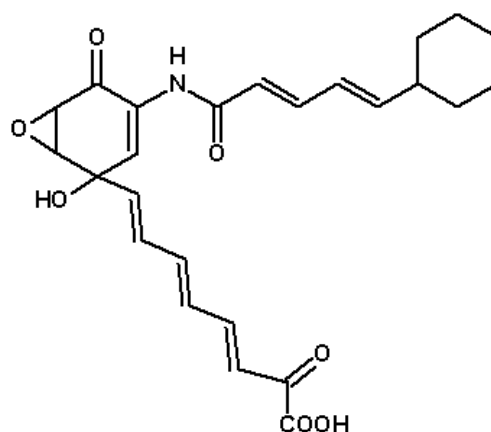
Obr. 2: Struktura colabomycinu A a colabomycinu D. Rozdíl ve struktuře manumycinových antibiotik typu I (colabomycin A) a II (colabomycin D). Převzato z Grote *et al.* (1988) a Wei *et al.* (1999).



Chinikomycin A



U-62,162



Nisamycin

Obr. 3: Struktura chinikomycinu A, U-62,162 a nisamycinu. Převzato z Li *et al.* (2005), Slechta *et al.* (1982) a Hayashi *et al.* (1993).

2.1.4 Biologická aktivita manumycinových antibiotik

Manumycinová antibiotika jsou neustále studována především pro jejich biologické aktivity. Jako první byla u manumycinů popsána aktivita antimikrobiální. Díky ní také bylo mnoho izolátů z této skupiny objeveno při cíleném vyhledávání nových přírodních antibiotik. Manumyciny typu I (viz. kapitola 2.1.3) vykazují poměrně významnou antimikrobiální aktivitu vůči gram-pozitivním bakteriím. Naopak na gram-negativní bakterie nemají prakticky žádný účinek (Omura *et al.* 1976, Brodasky *et al.* 1983, Zeeck *et al.* 1987, Grote *et al.* 1988b, Franco *et al.* 1991, Hayashi *et al.* 1993, Shu *et al.* 1994). Výjimkou jsou manumycin E, F a G, u kterých byla popsána nízká aktivita vůči gram-negativní bakterii *Escherichia coli* (Shu *et al.* 1994). Manumyciny typu II antimikrobiální vlastnosti nevykazují ani při vysokých koncentracích (Kohno *et al.* 1996). Z tohoto vyplývá, že určující strukturou molekul pro antimikrobiální aktivitu je patrně přítomnost epoxydové skupiny na mC₇N podjednotce. Další důležitou strukturou, která byla popsána jako důležitá pro biologickou aktivitu nejen u manumycinových antibiotik je C₅N podjednotka (Zhang *et al.* 2010). Cílová molekula a celkový mechanismus působení manumycinových antibiotik typu I je prozatím neznámý. Kromě antimikrobiálních aktivit vykazují manumycin A, alisamycin, asukamycin, colabomycin A a nisamycin také slabší antimykotickou aktivitu. Dále byla popsána u asukamycinu antikokcidální aktivita a u manumycinu A aktivita insekticidní (Omura *et al.* 1976, Zeeck *et al.* 1987, Grote *et al.* 1988b, Franco *et al.* 1991, Hayashi *et al.* 1993).

V současnosti jsou manumycinové látky intenzivně studovány především pro jejich potenciální protinádorové účinky. U manumycinu A byla popsána významná aktivita inhibice Ras-farnesyltransferázy (Hara *et al.* 1993). Ras je malý G-protein, který má klíčovou funkci při kontrole a regulaci buněčného růstu a dělení. Pro plnou aktivitu tohoto proteinu je nutná složitá posttranslační modifikace. Jedním z jejích kroků je připojení farnesyl-pyrofosfátu na C-terminální cysteinový zbytek Ras proteinu. Díky této modifikaci se může protein zakotvit do buněčné membrány, což je nutné pro jeho funkčnost (Goodman *et al.* 1990). Zakotvený G-protein Ras může existovat ve dvou různých formách. V aktivovaném stavu s vázaným GTP spouští regulační kaskádu vedoucí k dělení či diferenciaci buňky. Naopak ve stavu s navázaným GDP je regulační funkce proteinu umlčena. Mutace v genu pro Ras protein často vede k neschopnosti hydrolýzy GTP a Ras tedy zůstává neustále v aktivované GTP formě. To má za následek vznik nekontrolovatelného nádorového bujení. Ras protein je proto počítán mezi hlavní lidské onkogeny. Bylo odhadnuto, že mutace Ras proteinu je zodpovědná asi za 20 % všech nádorů. U nádorů pankreatu se jedná dokonce až o 90 % případů (Gibbs *et al.* 1994). Velmi nadějným cílem chemoterapeutické léčby u těchto nádorů se jeví inhibice aktivity Ras proteinu a to právě zablokováním buněčné Ras-farnesyltransferázy (Downward 2003). Díky této inhibici je signalizace Ras proteinu zablokována. Aktivita inhibice Ras-farnesyltransferázy byla popsána u manumycinu A, B a C, s nejvyšší aktivitou u manumycinu A (Hara *et al.* 1993). Velkou výhodou manumycinů pro jejich potenciální využití v praxi je vysoká specifita. Zdá se, že inhibují výhradně Ras-farnesyltransferázu, zatímco nejsou aktivní vůči velmi příbuznému enzymu geranyl-geranyltransferáze. Ten je schopný částečně suplovat funkci zablokované farnesyl-transferázy u nenádorových buněk. Navíc samotná aktivita geranyl-geranyltransferázy je nutná k řadě fyziologických modifikací ostatních proteinů v buňce. Výsledkem této specifity je poměrně malá cytotoxicita vůči nenádorovým buňkám (Finegold *et al.* 1990, Hara *et al.* 1993).

Jiné výzkumy ukázaly, že manumycin A je také schopen indukovat smrt nádorových buněk produkcí reaktivních forem kyslíku, tzv. ROS (Reactive Oxygen Species). K těmto vysoce reaktivním molekulám jsou zpravidla nádorové buňky velice náchylné. ROS spouští

kaspázovou kaskádu a tím apoptózu buňky nebo se přímo účastní poškození dvouvláknové DNA (Pan *et al.* 2005, Sears *et al.* 2008).

Protinádorový účinek manumycinu A byl prokázán *in vitro* i *in vivo* u buněk lidského fibrosarkomu HT1080 (Hara *et al.* 1993), buněk nádoru pankreatu (Ito *et al.* 1996, Kainuma *et al.* 1997). U manumycinu A a colabomycinu A byla popsána *in vitro* cytotoxická aktivita vůči buňkám myši leukémie L-1210 (Zeeck *et al.* 1987, Grote *et al.* 1988b). Slabší *in vitro* cytotoxický účinek proti různým nádorovým liniím byl popsán také u manumycinů D, E, F, G a u izolátů TMC A, B, C, D (Shu *et al.* 1994, Kohno *et al.* 1996). V současnosti jsou intenzivně studovány možné kombinace manumycinu A s dalšími účinnými látkami, které by společně vykazovaly ještě lepší protinádorové aktivity. Jako prozatím nejúspěšnější byla popsána trojkombinace látek manumycin A – combretastatin A4 fosfát – paclitaxel (Yeung *et al.* 2007). Další zkoumanou možností je např. kombinace se světlem aktivovanými pigmenty, jakým je třeba hypericin B (Sackova *et al.* 2011).

Některé manumycinové látky inhibují interleukin-1 β -konvertující enzym. Tento enzym proteolyticky štěpí interleukin-1 α , který je produkován aktivovanými monocyty nebo makrofágy při zánětu. Tímto štěpením vzniká aktivní forma interleukin-1 β . Tato aktivita byla popsána EI-1511-3, EI-1511-5, EI-1625-2, alisamycinu, *ent*-alisamycinu, manumycinu A, B, C, G, U-56,407 a také u asukamycinu (Tanaka *et al.* 1996, Striz *et al.* 2008).

Manumycin A je schopen inhibovat aktivitu IKK kinázy (I- κ B-Kinase). Ta se v přítomnosti cytokinu TNF- α (Tumor Necrosis Factor α) nebo interleukinu-1 aktivuje a fosforyluje transkripční faktor NF- κ B, který dále aktivuje transkripci genů zodpovědných za kontrolu tvorby zánětu a onkogeneze. Samotná IKK kináza se skládá ze tří proteinů: IKK α , IKK β a IKK γ . Manumycin A inhibuje IKK β protein, čímž je kompletně vyřazena aktivita celé IKK kinázy (Bernier *et al.* 2006).

Velmi intenzivně jsou v současné době studovány možnosti využití manumycinových látek v léčbě Alzheimerovy choroby. U manumycinu A byla popsána inhibiční aktivita vůči neutrální sfingomyelináze. Tento enzym hydrolyzuje sfingomyelin za vzniku ceramidu. Ceramid funguje jako druhý posel při aktivaci enzymu BACE1 (Beta-Secretase 1). Aktivní forma BACE1 štěpí APP protein (Amyloid Prekursor Protein), ze kterého vzniká tzv. A β (Amyloid- β -peptid). Tento peptid se hromadí v mozku během průběhu Alzheimerovy choroby a je jedním z hlavních důvodů vznikající demence (Costantini *et al.* 2005). Manumycin A, B a C je také funkčním inhibitorem acetylcholinesterázy, která katalyzuje rozpad acetylcholinu na cholin a acetát. Tento rozpad je v buňkách fyziologicky navozován pro ukončení synaptického přenosu vzruchu. V průběhu Alzheimerovy choroby dochází zpravidla k úbytku acetylcholinu, díky němuž k nervovým vzruchům dochází. Inhibitor acetylcholinesterázy blokuje rozpad acetylcholinu, a tudíž zvyšuje jeho koncentraci na synaptických spojeních. Výzkumy z posledních let potvrzují, že účinnost manumycinu A, B a C je minimálně srovnatelná s komerčně dostupným a v praxi používaným preparátem Tacrine[®] (Cognex 1993). Dokonce bylo prokázáno, že manumyciny mají mnohem lepší specifitu vůči acetylcholinesteráze a neovlivňují, na rozdíl od tohoto komerčně dostupného preparátu, významně butyrylcholinesterázu, jejíž nespecifická inhibice vede k výrazným vedlejším účinkům (Zheng *et al.* 2007).

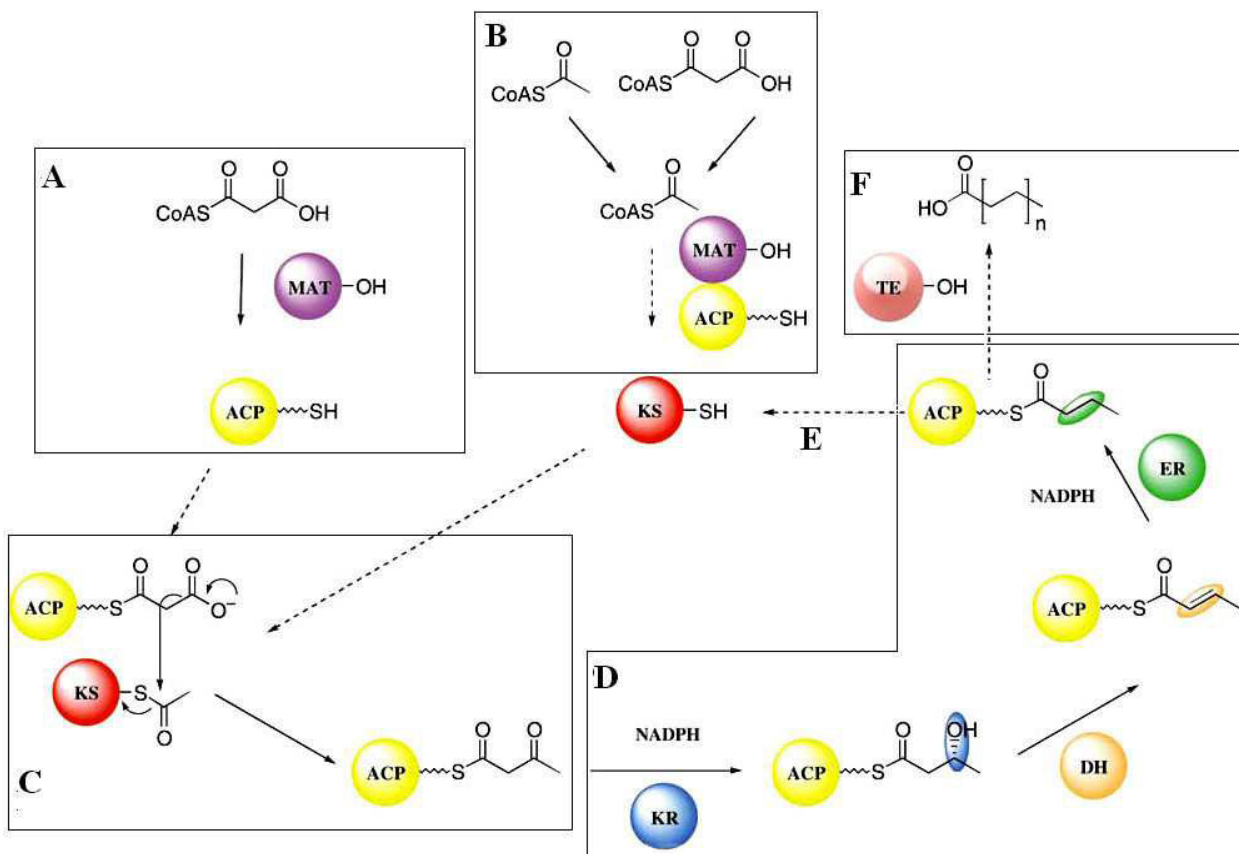
2.2 Biosyntéza polyketidových látek

2.2.1 Podobnost a rozdíly mezi biosyntézou polyketidů a mastných kyselin

Biosyntéza mastných kyselin

Polyketidová syntéza je ve své podstatě velmi podobná syntéze mastných kyselin. Tu zajišťují velké enzymatické systémy nazývané syntázy mastných kyselin (FAS – Fatty Acid Synthase). FAS se nachází v každé živé buňce. Samotná syntéza mastných kyselin je založena na Claisenově kondenzaci malonylových (výjimečně i jiných) podjednotek, které jsou postupně připojovány ke startovací podjednotce. Tou je v tomto případě nejčastěji acetyl, který je odvozen buďto přímo od acetyl-CoA nebo vzniká dekarboxylací malonyl-CoA (Obr. 4). Výsledkem je dlouhý acylový řetězec. Během biosyntézy je startovací jednotka nejprve navázána na thiolovou skupinu cysteinu enzymu β -ketoacylsyntázy (KS). Dále je malonylová prodlužovací jednotka pomocí enzymu malonyl-CoA:ACP-transacyláza (MAT) navázána z malonyl-CoA na thiolový zbytek specifického ACP proteinu (Acyl-Carrier-Protein), který je také jednou z důležitých součástí každého FAS komplexu (Obr. 4). Samotný thiolový zbytek se nenachází přímo na ACP proteinu, ale na specifické fosfopanteteinové skupině, která je připojena během posttranslační modifikace na serinový zbytek ACP proteinu (Walsh *et al.* 1997). Fosfopanteteinová skupina funguje jako dlouhé pružné rameno, které drží celý vznikající řetězec a je esenciální pro funkčnost ACP proteinu i celého FAS komplexu. Po navázání malonylu na ACP katalyzuje KS iniciovaná navázaným acylem první kondenzaci, jejímž výsledkem je vznik β -ketoesteru (Obr. 4). V případě bakteriální FAS zprostředkovává tuto první kondenzaci KS typu III (FabH u *E. coli*) (Rock & Jackowski 2002). Vzniklý β -ketoester se následně celý váže na ACP. V další fázi následují vždy tři stejné enzymatické kroky vedoucí k odstranění β -kyslíku, který vzniká při každé kondenzační reakci (Obr. 4). Konkrétně je to redukce ketoreduktázou (KR), dehydratace dehydratázou (DH) a ve finále další redukce enoylreduktázou (ER). Po proběhnutí všech těchto reakcí je možno připojit ke vznikajícímu řetězci další malonylovou podjednotku a opakovat celý cyklus. Ten začíná opětovným navázáním vznikajícího řetězce z ACP na KS a další kondenzací malonylové podjednotky. V elongačních kondenzacích se uplatňují KS typu I nebo II (FabB a FabF u *E. coli*). KS I a II jsou velmi příbuzné enzymy, které nelze rozlišit na základě jejich sekvence, avšak vykazují některé rozdílné substrátové specifity. Např. KS I se účastní výhradně biosyntézy nenasycených mastných kyselin (Rock & Jackowski 2002). Reakce pokračuje dalšími elongacemi, dokud není dosaženo požadované délky řetězce (nejčastěji do délky šestnácti uhlíků – kys. palmitová). Při dosažení finální délky se uplatňuje poslední enzym – thioesteráza (TE) (Obr. 4). Výsledný produkt je jeho působením uvolněn ve formě volné mastné kyseliny nebo acylesteru. Popsaný mechanismus je shodný pro všechny FAS systémy. Ve všech FAS lze tedy odlišit komponenty s těmito enzymatickými aktivitami – KS, KR, DH, ER, TE, ACP a MAT.

FAS systémy jsou rozdělovány do skupin. FAS II systém byl popsán u bakterií, některých parazitů, ale také v mitochondriích nebo chloroplastech. Jedná se zpravidla o jednotlivé proteiny s monoenzymatickými funkcemi, které se postupně podílejí na syntéze mastné kyseliny. FAS I byl popsán jako velký multienzymatický protein, který obsahuje mnoho katalytických míst pro jednotlivé kroky biosyntézy. Typicky se nachází u eukaryotních organismů. Toto rozlišení se stalo základem i pro dělení polyketid-syntáz.



Obr. 4: Průběh biosyntézy mastných kyselin. (A) vazba malonylu z malonyl-CoA na malonyl-ACP, (B) iniciace KS navázáním acetylu (jeho zdrojem je přímo acetyl-CoA nebo vzniká dekarboxylací malonyl-CoA), (C) kondenzace (přenos malonylu z malonyl-ACP na acyl-KS), (D) tříkrokové odstranění β -kyslíku, (E) přenos rostoucího acylového řetězce z ACP na KS k další kondenzaci, (F) odštěpení finálního produktu při dosažení požadované délky acylového řetězce. Převzato z Staunton & Weissman (2001).

Biosyntéza polyketidů

Biosyntéza polyketidů je rovněž založena na postupné Claisenově kondenzaci acyl-CoA substrátů a v buňce je zajištěna enzymatickými systémy, které se nazývají polyketid-syntázy (PKS). Těmi disponují především bakterie a houby. Byly také popsány PKS systémy u vyšších rostlin nebo některých protist (Zhu *et al.* 2002, Flores-Sanchez & Verpoorte 2009). Od FAS se PKS liší především širším spektrem substrátů, které mohou jejich enzymy akceptovat jako startovací nebo prodlužovací jednotky. Startovací jednotkou může být nejen acetyl-CoA, kterou klasicky využívá FAS systém. Běžné je použití butyryl-CoA, propionyl-Co, cyklohexyl-CoA nebo i aromatického benzyl-CoA. Příkladem nezvyklé startovací jednotky je např. i biosyntéza horního (CHC-CoA) a spodního (aktivovaná 3,4-AHBA) řetězce u asukamycinu (viz. kapitola 2.2.6). Prodlužovací jednotkou může být u PKS vedle malonyl-CoA i metylmalonyl-CoA, etylmalonyl-CoA, metoxymalonyl-CoA a další (Staunton & Weissman 2001). Druhým hlavním rozdílem u PKS je, že vznikající β -ketoester nemusí být vždy podroben kompletnímu tříkrokovému cyklu (KR, DH, ER) vedoucímu k odstranění β -kyslíku, který vzniká při každém připojení prodlužovací jednotky. Před další kondenzací tak mohou proběhnout jen některé nebo žádná z těchto reakcí. Finální polyketidy tedy mohou nést alkylové, hydroxylové, enoylové nebo keto skupiny (Bibb *et al.* 1989).

Ve fázi, kdy je rostoucí polyketidový řetězec vázaný na ACP může proběhnout mnoho dalších modifikací řetězce, který zajišťují přídatné enzymy nebo přímo enzymové domény samotné PKS (oxidace, cílená cyklizace atd.). Po ukončení polyketidové syntézy a fyzického oddělení vzniklého produktu od PKS systému jsou látky často ještě dále modifikovány. Častá je např. metylace, glykosylace, oxidace, další cyklizace nebo aromatizace polyketidu. Enzymy účastníci se těchto úprav se souhrnně označují jako tzv. „tailoring“ enzymy (Weissman 2009). Rozličnost úprav vznikajícího řetězce, využití různých startovacích a prodlužovacích jednotek a různé další úpravy pomocí „tailoring“ enzymů jsou důvodem obrovské rozmanitosti známých látek vznikajících touto biosyntetickou drahou.

Velká podobnost FAS a PKS systémů umožňuje v některých případech sdílení či nahraditelnost jednotlivých enzymů pro obě dráhy. Typickým příkladem je enzym MAT. Tuto enzymatickou aktivitu zajišťuje jeden enzym pro PKS i FAS (viz. kapitola 2.2.3). Byly také popsány látky, které jsou syntetizovány z části FAS i PKS systémem. Typickými zástupci takovýchto FAS/PKS biosyntetických hybridů jsou např. komponenty buněčné stěny u mykobakterií (Kolattukudy *et al.* 1997).

2.2.2 Rozdělení PKS

Podle vzoru FAS systémů jsou i PKS rozdělovány do skupin (typ I, II a III). V literatuře jsou někdy PKS děleny také na iterativní, modulární a iterativně modulární nebo jsou popisovány jako jednotlivé unikátní biosyntetické systémy, které nelze jednoduše zařadit do navzájem jasně oddělených skupin I, II a III (Muller 2004).

Celkově využívají PKS systémy dvou hlavních strategií. V prvním případě se jedná o mohutný, multimodulární enzym (PKS I, modulární PKS). Každý z jeho modulů zprostředkovává právě jeden krok elongace polyketidového řetězce. Podle enzymatických aktivit v jednotlivých modulech a vzájemného pořadí těchto modulů lze poměrně jednoduše predikovat, jakou strukturu bude mít výsledný produkt. Klasickým příkladem PKS I jsou biosyntetické systémy makrolidů, např. DEBS-PKS (6-Deoxyerythronolid B Synthase-PKS) zapojený v biosyntéze erytromycinu (Obr. 5) (Donadio *et al.* 1991).

Druhou skupinou jsou PKS systémy, které využívají enzymatické aktivity nutné pro vznik polyketidového řetězce opakovaně (PKS II, iterativní PKS). Pro jejich zapojení v biosyntéze aromatických bakteriálních polyketidů jsou někdy také označovány jako bakteriální aromatické polyketid-syntázy. Iterativní PKS však syntetizuje také např. lineární řetězce manumycinů. Díky opakovanému (iterativnímu) použití stejných enzymů během celé biosyntézy neexistuje korelace mezi počtem aktivních míst a počtem enzymatických kroků v biosyntéze. Tudíž je velmi těžké predikovat strukturu výsledného produktu. Modelovým PKS II systémem je např. PKS podílející se na biosyntéze antibiotika actinorhodinu (Malpartida & Hopwood 1986).

Poměrně nedávno byl popsán zvláštní biosyntetický systém PKS III. Ten se podílí např. na syntéze chalkonu a dalších metabolitů u vyšších rostlin. Bylo popsáno také několik PKS III systémů u bakterií nebo hub (Austin & Noel 2003, Katsuyama & Ohnishi 2012). Jedná se o homodimerní iterativní ketosyntázu, která zprostředkovává kondenzaci malonyl-CoA a zároveň následné úpravy řetězce, především specifickou cyklizaci. PKS III nevyužívá narozdíl od ostatních PKS systémů ACP protein, ale iniciuje syntézu přímo na startovací jednotce. Tou může být např. acetyl-CoA nebo složitější struktury, jako je např. *p*-coumaryl-CoA a další (Flores-Sanchez & Verpoorte 2009).

2.2.3 Minimální PKS

V genovém shluku PKS systémů typu II (iterativní systémy) lze vždy rozlišit minimálně tři základní složky, které jsou esenciální pro polyketidovou syntézu. Jedná se o ACP protein, funkční KS (typu I/II) a tzv. chain-length-factor (CLF), který se podílí na regulaci délky vznikajícího polyketidového řetězce. Při pokusech o provedení polyketidových reakcí v *in vitro* systému bylo zjištěno, že ACP, KS a CLF samostatně nejsou schopny katalyzovat kondenzaci malonyl-CoA. Další, čtvrtou nutnou složku pro započetí a proběhnutí reakcí v *in vitro* systémech, je FabD malonyl-CoA:ACP-transacyláza (MAT). FabD byla již dříve popsána jako jeden z enzymů syntézy mastných kyselin (Rock & Jackowski 2002). Katalyzuje přenos malonylu z malonyl-CoA na ACP a je v buňce nejspíš využívána PKS i FAS systémem. Jedná se tedy o enzym, který v buňce propojuje primární a sekundární metabolismus (Carreras & Khosla 1998). Tyto základní enzymatické složky jsou souhrnně označovány jako minimální PKS. Ta syntetizuje pouze základní polyketidovou kostru, která je pomocí dalších enzymů PKS systému přeměněna na finální produkt. Pokud biosyntéza probíhá pouze za účasti minimální PKS, produkt se zpravidla velmi liší od finální látky. Ve vznikajících neredukovaných, vysoce reaktivních polyketidových řetězcích dochází často k samovolným cyklizacím. Samovolné cyklizace vedou zpravidla k nabytí zcela odlišných struktur molekul (McDaniel *et al.* 1994).

KS a CLF společně vytváří těsný heterodimer. ACP se váže slabě, ale velmi specificky ke KS (Tang *et al.* 2003b). KS I/II je funkčním enzymem jak v iniciaci syntézy, tak ve všech následujících elongačních reakcích. V minulosti se předpokládalo, že o iniciaci syntézy se stará CLF. To však bylo vyvráceno pozdějším výzkumem krystalografické struktury heterodimeru KS/CLF z PKS actinorhodinu (viz. kapitola 2.2.5).

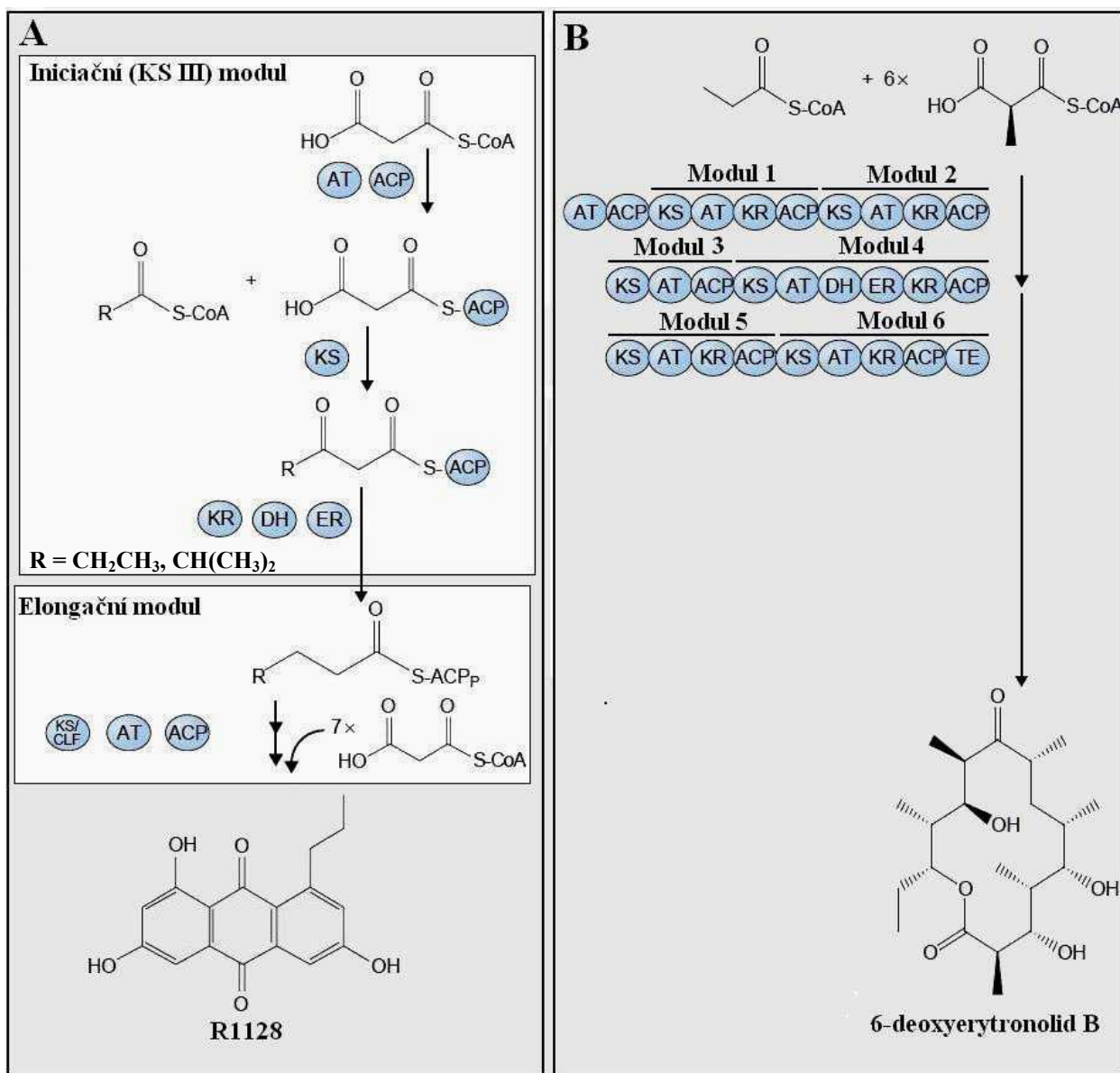
2.2.4 Možnosti iniciace polyketidové syntézy

Asi nejlépe prostudovaný je PKS systém, který se účastní biosyntézy antibiotika a modrého pigmentu actinorhodinu z producenta *Streptomyces coelicolor* A3(2) (Wright & Hopwood 1976). Prvním krokem actinorhodinové PKS (ActPKS) je dekarboxylace malonyl-ACP, kterou katalyzuje dimer KS/CLF. Vzniká acetyl, který je následně přenesen z ACP na KS/CLF, čímž je tento dimer iniciován k dalšímu možnému připojování malonylových jednotek (Malpartida & Hopwood 1986). Stejný acetyl-iniciační systém využívá při biosyntéze velké množství z dosud popsaných aromatických PKS.

U některých PKS systémů však byly popsány také různé alternativní iniciační systémy nevyužívající dekarboxylaci malonyl-CoA na acetyl. Modelem pro tento případ je PKS podílející se na syntéze antagonisty estrogenového receptoru R1128 (ZhuPKS) (Hori *et al.* 1993). Při biosyntéze R1128 je v první fázi namísto acetylu použit propionyl-CoA (popř. izobutyryl-CoA). Vedle klasické minimální PKS zde funguje ještě jeden separátní systém (tzv. iniciační modul), který obsahuje homodimerní KS (ZhuH), specifickou AT (ZhuC) a vlastní ACP (ZhuG). ZhuH patří do skupiny KS typu III (KS III) a vykazuje velkou podobnost s FabH β -ketoacylsyntázou mastných kyselin (viz. kapitola 2.2.1). Tento druhý systém zajišťuje právě první, iniciační krok biosyntézy. Nejprve je připojen malonyl-CoA ke specifickému ACP proteinu ZhuG. Následně ZhuH zajišťuje kondenzaci malonylu s propionyl-CoA či izobutyryl-CoA. Na vzniklém meziprojektu dále proběhne tříkrokové odstranění β -kyslíku. V případě R1128 se na tomto kroku podílí patrně enzymy FAS systému, jelikož v genovém shluku pro R1128 tyto enzymy nebyly identifikovány. Teprve takto iniciovaná startovací jednotka je předána minimální PKS (elongační modul), která katalyzuje zbylé kondenzační kroky (Obr. 5) (Marti *et al.* 2000). Základem oddělení obou reakcí je rozdílná afinita ACP proteinů k různým substrátům a různá afinita KS k těmto ACP (Tang *et*

al. 2003b). Stejný KS III iniciační systém využívá také např. PKS anitparazitika frenolicinu (FrenPKS) (Bibb *et al.* 1994) či PKS inhibitoru glutathion-S-transferázy benastatinu (BenPKS) (Xu *et al.* 2007). Je velmi pravděpodobné, že podobný KS III iniciační systém je zapojen do formace horního řetězce některých manumycinových antibiotik (viz. kapitola 2.2.6).

Průběh iniciace polyketidové syntézy významně ovlivňuje strukturu finální látky a může být jednou z možností umělých úprav polyketidů (viz. kapitola 2.3). U BenPKS bylo prokázáno, že při vyřazení genu pro KS III (BenQ) přebírá jeho funkci automaticky enzym FabH z FAS systému. Ten inkorporuje do finální molekuly benastatinu alternativní lineární startovací jednotky používané v syntéze mastných kyselin (Xu *et al.* 2009).



Obr. 5: Rozdíl mezi PKS I (A) a PKS II (B) systémy. (A) iniciační (KS III) a elongační modul ZhuPKS syntetizující R1128, (B) jednotlivé moduly DEBS-PKS syntetizující prekurzor erytromycinu 6-deoxyerythronolid B. Převzato z Liou & Khosla (2003).

2.2.5 Regulace délky vznikajících polyketidových řetězců

Funkce CLF v heterodimeru KS/CLF

Hlavním parametrem určujícím finální strukturu polyketidu je délka vznikajícího polyketidového řetězce. Způsob, jakým je tato délka regulována, není dodnes zcela vyjasněn. Teorie, že hlavním faktorem ovlivňujícím délku řetězce by mohl být právě CLF, byla poprvé potvrzena heterologní expresí různých kombinací KS a CLF. Modelovými látkami pro tento experiment byly aromatické polyketidy actinorhodin, granaticin a tetracenomycin. Actinorhodin a granaticin jsou oba oktaketidy (během biosyntézy dojde celkem k osmi kondenzacím malonyl-ACP a celkově má tedy vzniklý polyketidový řetězec 16 uhlíků). Tetracenomycin je deketetid (deset kondenzací). Jednotlivé geny pro složky heterodimeru KS/CLF byly exprimovány v *Streptomyces coelicolor* CH999. Jedná se o mutantní kmen *Streptomyces coelicolor* A3(2), v jehož chromosomu byl kompletně vydeletován genový shluk pro produkci actinorhodinu. Při koexpresi KS z producenta actinorhodinu (ActKS) a CLF z producenta granaticinu (GraCLF) společně s ACP proteiny nedochází k žádné změně v délce řetězce u výsledného produktu oproti minimální ActPKS a GraPKS. Vzniká vždy oktaketid. Při spojení tetracenomycinové KS (TcmKS) s actinorhodinovým CLF (ActCLF) byl syntetizován taktéž oktaketid. To jednoznačně označilo CLF jako faktor zodpovědný za délku řetězce. Při spojení ActKS a TcmCLF nedocházelo k syntéze žádného produktu (McDaniel *et al.* 1993). V dalších experimentech bylo ukázáno, že TcmCLF lze funkčně spojit pouze s mutovanou ActKS, která obsahuje uprostřed sekvence krátký úsek z TcmKS. To opět potvrdilo funkci CLF, ale hlavně ukázalo na vysokou specifitu vazby mezi KS a CLF (Burson & Khosla 2000).

Jedním z posledních popsaných CLF je FdmCLF z PKS podílející se na biosyntéze pentadekaketidu fredericamycinu (patnáct kondenzací) (Wendt-Pienkowski *et al.* 2005). Jedná se o prozatím nejdelší popsaný řetězec u aromatických bakteriálních polyketidů. Funkce FdmCLF se v mnohém liší od prozatím popsaných CLF. Při expresi samotné minimální FdmPKS vznikají produkty o velikosti undekaketidu (jedenáct kondenzací) až dodekaketidu (dvanáct kondenzací). Je tedy evidentní, že na finální délce fredericamycinu se podílí kromě CLF ještě další, prozatím neznámý faktor. Významnou roli by zde mohl hrát KS III iniciační systém, který syntetizuje šestiuhlíkovou startovací jednotku, což je právě délka chybějící dodekaketidu do finální délky pentadekaketidu (Szu *et al.* 2011).

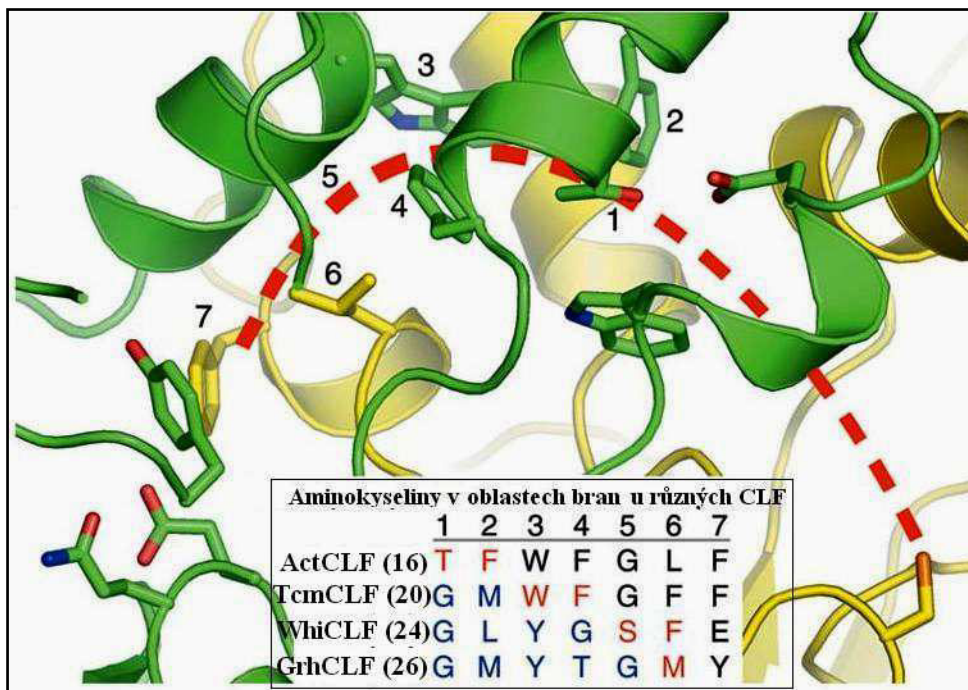
Struktura CLF a mechanismus regulace délky polyketidu

Aminokyselinová sekvence popsaných CLF je poměrně blízká sekvenci KS (Obr. 6). U heterodimeru KS/CLF se tedy jedná patrně o ukázkou evoluce původního homodimeru. KS podjednotka se specializovala na katalýzu, zatímco CLF výhradně na regulaci délky řetězce. KS nese v aktivním místě vysoce konzervovaný cystein (C169 v případě ActKS), který společně s dvěma histidiny v okolí vytváří tzv. katalytickou triádu (H309 a H346 u ActKS). Cystein konkrétně zprostředkovává připojení rostoucího řetězce přes thioesterovou vazbu k molekule KS. Popsané CLF tento cysteinový zbytek v aktivním místě vždy postrádají. Stejně tak postrádají oba histidiny katalytické triády (Obr. 6). Původní představa byla taková, že do regulace délky může být zapojena aminokyselina, která se nachází u CLF ve stejné pozici jako aktivní cystein u funkční KS. Tato aminokyselina byla experimentálně nahrazena za jině, avšak výsledné produkty se od původního nijak nelišily, což tuto teorii vyvrátilo (Dreier & Khosla 2000).

Při biosyntéze mastných kyselin musí rostoucí řetězec vždy opustit KS, aby mohl být dalšími enzymy podroben kompletní redukci β -kyslíku (viz. kapitola 2.2.1). Naopak při

biosyntéze polyketidů je žádoucí, aby rostoucí řetězec zůstal izolován od okolního prostředí, protože neredukovaný polyketid je extrémně reaktivní a podléhá snadno spontánním cyklizacím (McDaniel *et al.* 1994). Již dříve se tedy předpokládalo, že minimální PKS je nějakým způsobem schopna oddělit rostoucí polyketid od okolí. V roce 2003 byl vytvořen homologní model dimeru ActKS/CLF vygenerovaný na základě známé struktury FabH homodimeru (Protein Data Bank: 1QXG). Tento model ukázal, že syntéza polyketidového řetězce probíhá ve struktuře označené jako polyketidový tunel. Homologní model však neposkytl dostatečné rozlišení v této oblasti (Tang *et al.* 2003a). O rok později byla proto vytvořena krystalografická struktura ActKS/CLF (Protein Data Bank: 1TQY). V ní byl již poměrně detailně popsán cca 17Å dlouhý amfipatický polyketidový tunel, který začíná v pozici konzervovaného cysteinu aktivního místa KS a prochází společným rozhraním obou podjednotek (Obr. 7). Společný povrch obou proteinů činí asi 20,2 % plochy monomerního povrchu molekul. Aminokyselinové zbytky, které tvoří stěny polyketidového tunelu pochází z KS i CLF a jsou mezi různými PKS značně konzervované. Tunel je zakončen koncovou strukturou helix-turn-loop, která je součástí CLF podjednotky (Keatinge-Clay *et al.* 2004). Porovnání této koncové struktury u různých CLF ukázalo taktéž vysokou míru konzervovanosti, až na aminokyseliny v pozici 112 a 116 (počítáno dle ActCLF). Srovnáním CLF podílejících se na biosyntéze různě dlouhých produktů v rozmezí oktaketidu až dodekaketidu, se ukázal trend, že čím je výsledný řetězec delší, tím méně objemné aminokyseliny jsou obsazeny v těchto dvou pozicích. Stejně tak konzervovaný fenylalanin v pozicích 109 a 133 u ActCLF je u dodekaketidového TcmCLF vyměněn za menší glycin a izoleucin. Na základě tohoto vznikl předpoklad, že právě objemnost aminokyselin v určitých pozicích je klíčem k regulaci délky výsledného polyketidového řetězce. Experimentálně byla tato teorie testována cílenou výměnou aminokyselin v těchto místech. Při záměně fenylalaninu 116 za menší alanin u ActCLF (ActCLF:F116A) bylo při koexpresi s ActKS a ACP identifikováno v *in vivo* systému 94 % produktů jako klasický oktaketid a 6 % jako dekaketid. V *in vitro* systému bylo zastoupení dekaketidů dokonce 64 %. V případě dvojité mutace ActCLF:F109A/F116A se produkce dekaketidu ještě zvýšila v *in vivo* systému na 66 %, v *in vitro* na 96 %. To jasně potvrdilo závislost délky polyketidu na objemnosti aminokyselin v těchto pozicích (Tang *et al.* 2003a). V krystalografické struktuře ActKS/CLF bylo identifikováno ještě několik dalších míst, které patrně významně regulují velikost vznikajícího řetězce. Všechna tato místa byla označena jako tzv. brány. Na ActKS/CLF se jich nachází celkem sedm (Obr. 7). Otvírání a uzavírání těchto bran je s největší pravděpodobností mechanismem, který určuje finální délku řetězce. Pokud je brána polyketidového tunelu uzavřená velkým aminokyselinovým zbytkem, dochází k ukončení biosyntézy. Naopak otevřená brána dovoluje připojit další malonylovou jednotku a tak prodloužit řetězec k oblasti další brány, která je opět uzavřená nebo otevřená. Porovnání aminokyselin u různých dalších CLF v předpokládaných oblastech bran tuto teorii také plně podporuje (Obr. 7) (Keatinge-Clay *et al.* 2004). Přesný mechanismus ukončení polyketidové syntézy a oddělení řetězce od dimeru KS/CLF při dosažení finální délky je prozatím stále neznámý.

Vytvoření krystalografické struktury navíc vyvrátilo, že by se CLF podjednotka podílela katalyticky v iniciaci biosyntézy. V předchozích výzkumech FAS bylo ukázáno, že KS z FAS systému lze jednoduchou mutací, která nahradí cystein v aktivním místě za glutamin, přeměnit na funkční dekarboxylázu. Myslelo se proto, že jelikož CLF tento cystein také postrádá, může mít funkci dekarboxylázy v iniciaci polyketidové syntézy (viz. kapitola 2.2.4). Prostor, kde by měla tato katalýza u CLF probíhat je však fyzicky příliš malý a vazba malonyl-CoA do těchto míst je zcela vyloučená. Iniciační dekarboxylaci tedy u PKS katalyzuje KS podjednotka (Keatinge-Clay *et al.* 2004).



Obr. 7: Detail struktury polyketidového tunelu dimeru ActKS/CLF. KS podjednotka je označena žlutou barvou, CLF podjednotka zelenou barvou. Červenou čarou je naznačen prostor, kudy prochází syntetizovaný polyketidový řetězec. Otevřené brány jsou označeny modře (malé aminokyselinové zbytky), uzavřené brány červeně (velké aminokyselinové zbytky). V tabulce je uvedeno porovnání aminokyselin vyskytujících se v sedmi označených oblastech bran u různých CLF (Tcm= tetracenomycin, Gri = griseorhodin B, Whi = whiE sporový pigment). Číslo v závorce udává počet atomů uhlíku v syntetizovaném polyketidovém řetězci. Převzato z Keatinge-Clay *et al.* (2004).

Regulace délky polyketidových řetězců u manumycinových antibiotik

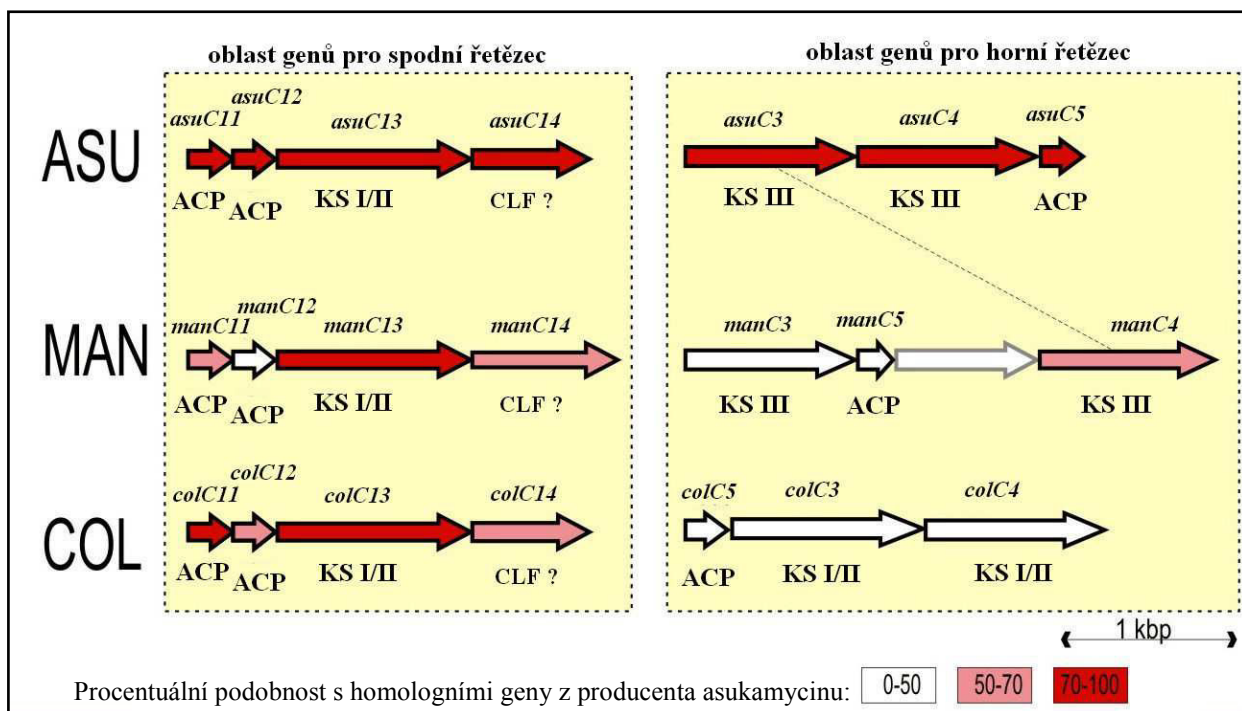
Dosud popsané CLF proteiny a mechanismy regulace délky polyketidových řetězců byly zkoumány výhradně u aromatických látek v rozmezí hexaketidu až pentadekaketidu. Prozatím nebyl proveden žádný výzkum způsobu regulace délky kratších polyketidových řetězců, které jsou např. součástí struktury manumycinových antibiotik. Délka spodního řetězce u známých manumycinů je v rozmezí diketidu (U-62,162) až tetraketidu (colabomyciny).

V biosyntetickém shluku asukamycinu, manumycinu A a colabomycinu E byly popsány geny, které se různým způsobem podílejí na biosyntéze horního a spodního polyketidového řetězce. V případě spodního řetězce je situace u všech třech zástupců podobná. Vždy jsou zde přítomny geny pro ACP protein (*asu/man/colC11*), ArCP protein (Aryl-Carrier-Protein) (*asu/man/colC12*), KS I/II (*asu/man/colC13*) a jeden další protein, který vykazuje určitou podobnost s KSI/II (*asu/man/colC14*) (Obr. 8) (Rui *et al.* 2010, Petříček *et al.* – nepublikovaná data). Všechny tyto geny jsou patrně součástí jedné transkripční jednotky. Bylo prokázáno, že inzerční mutace vedoucí k vyřazení funkce genu *asuC13* (KS I/II) u producenta asukamycinu vede k zastavení syntézy spodního řetězce a tím i k zastavení produkce asukamycinu. Jedná se tedy o esenciální KS pro syntézu spodního řetězce (Rui *et al.* 2010). Sekvence AsuC13 obsahuje pro KS typickou katalytickou triádu C151, H285 a H322. AsuC14 je do jisté míry homologní s AsuC13. Postrádá však tuto katalytickou triádu a část sekvence na N-konci (Obr. 6). Touto strukturou se tedy podobá dosud popsaným CLF proteinům. Porovnání sekvencí AsuC14 a vybraných CLF podílejících se na biosyntéze aromatických látek v rozmezí hexaketidu až pentadekaketidu ukazuje

v některých místech přítomnost stejných konzervovaných sekvencí. Na druhou stranu AsuC14 mnoho konzervovaných sekvencí zastoupených u těchto známých CLF postrádá (Obr. 6).

Vliv delece samotného genu *asuC14* na produkci asukamycinu prozatím nebyl publikován v žádné práci. Z umístění v biosyntetickém shluku a sekvence AsuC14 lze usuzovat, že by se mohlo jednat o zcela nový typ CLF proteinu, který tvoří heterodimer s KS I/II AsuC13 a určuje délku těchto kratších polyketidových řetězců (tři u asukamycinu a manumycinu A, tetra u colabomycinu E). Teorii, zda je AsuC14 skutečně zodpovědný za regulaci délky řetězce, by měla vysvětlit analýza produkovaných manumycinů u mutanta *Streptomyces nodosus* ssp. *asukaensis* s tzv. „in-frame“ delecí (nedochází k posunu čtecího rámce ani vytvoření předčasného stop kodonu) v oblasti genů *asuC13–C14*, ve kterém budou exprimovány geny *C13* a *C14* (společně s ACP) z přírodních producentů asukamycinu (*Streptomyces nodosus* ssp. *asukaensis*), manumycinu A (*Streptomyces parvulus* Tü64) a colabomycinu E (*Streptomyces* SOK1/5-4) v různých sadách.

Situace u horního řetězce je ještě složitější. U asukamycinu bylo experimentálně prokázáno, že se na biosyntéze podílejí produkty genů *asuC3*, *asuC4* (kódují dvě KS III) a *asuC5* (kóduje ACP protein). Mutant s inserční mutací těchto genů vedoucí k jejich funkčnímu vyřazení je však stále schopen produkovat malé množství kompletního asukamycinu. Navíc se zvyšuje podíl biosyntézy minoritních látek produkovaných producentem asukamycinu. Zdá se tedy, že tyto KS III hrají určitou roli v iniciaci biosyntézy horního řetězce (Rui *et al.* 2010). V genovém shluku pro biosyntézu manumycinu A se ve stejné oblasti nacházejí také dvě KS III a navíc jeden další protein s prozatím neznámou funkcí. V případě colabomycinu E se zde nachází pouze dvě KS I/II (Obr. 8).

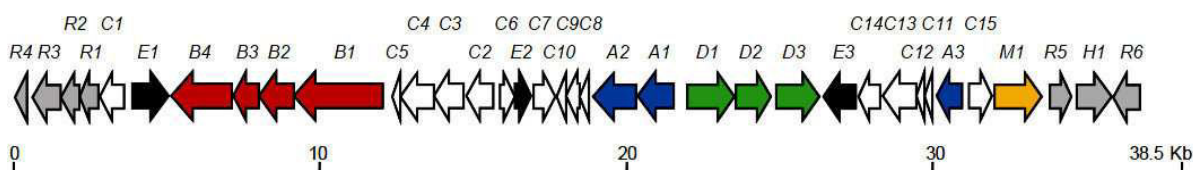


Obr. 8: Porovnání dvou oblastí z biosyntetických genových shluků asukamycinu (ASU), manumycinu A (MAN) a colabomycinu E (COL), kde se nacházejí geny s předpokládanou či ověřenou funkcí v biosyntéze spodního a horního polyketidového řetězce. Převzato z Petříček *et al.* (nepublikovaná data).

2.2.6 Biosyntéza manumycinových látek

Biosyntéza manumycinových antibiotik byla prozatím nejlépe prostudována u asukamycinu. U něho byl izolován kompletní biosyntetický shluk genů, který byl osekvenován a anotován (GenBank No. GQ926890). Velikost genového shluku byla určena na 63 922 bp a celkově v něm bylo popsáno 36 potenciálních otevřených čtecích rámců. K nim byla následně přiřazena jejich hypotetická funkce na základě sekvenční podobnosti s jinými geny a tato funkce byla u většiny experimentálně ověřena. Geny zapojené v různých částech biosyntézy, transkripční regulaci či exportu asukamycinu z bakteriální buňky byly rozříděny dle své funkce do celkem osmi skupin (Obr. 9) (Rui *et al.* 2010). V současnosti se pracuje také na objasnění kompletní biosyntetické dráhy manumycinu A a colabomycinu E.

Producenti manumycinových antibiotik často produkují více než jednu látku manumycinového typu. Z nich je zpravidla jedna látka majoritní. Kromě majoritní látky může být syntetizováno větší či menší množství minoritních manumycinů, tzv. kongenerů. Např. producent manumycinu A produkuje také malé množství manumycinu B a C (Sattler *et al.* 1993). Producent asukamycinu produkuje menší množství manumycinu G, manumycinu E, EI-1511-5 a U-56,407 (Hu & Floss 2006). Tyto látky se nejčastěji liší ve startovací jednotce horního řetězce a vznikají pravděpodobně ne zcela specifickou volbou prekurzorů pro syntézu manumycinových řetězců.



Obr. 9: Biosyntetický shluk asukamycinu u producenta *Streptomyces nodosus* ssp. *asukaensis* bez regulačních sekvencí. Modře jsou označeny geny účastnící se biosyntézy mC₇N podjednotky, červeně geny pro syntézu CHC-CoA, bíle pro syntézu horního a spodního polyketidového řetězce, zeleně pro syntézu C₅N podjednotky, šedě jsou označeny transkripční faktory, černě geny pro oxidaci mC₇N podjednotky a žlutě gen pro asukamycinový exporter. Převzato z Rui *et al.* (2010).

Biosyntéza mC₇N podjednotky

Základním prekurzorem mC₇N podjednotky je kyselina 3-amino-4-hydroxybenzoová (3,4-AHBA) (Gould *et al.* 1996). Díky tomuto zjištění byly v minulosti manumyciny zařazeny do samostatné skupiny látek. Původně totiž existoval názor, že se jedná o podskupinu ansamycinů, které mají porušený či nekompletní řetězec. Ty však jako prekurzor využívají 3,5-AHBA. Prekurzory 3,4-AHBA jsou l-aspartát-4-semialdehyd (ASA), který pochází z Krebsova cyklu a dyhydroxyaceton nebo dihydroxyacetonfosfát (DHAP). Zdrojem DHA nebo DHAP je trióza. Mezi DHA/DHAP a ASA proběhne kondenzace a následná cyklizace (Thiericke *et al.* 1990). V případě asukamycinu se na formaci mC₇N podjednotky podílejí geny ze skupiny A (Obr. 9). Po zformování je 3,4-AHBA pomocí AsuA2 aktivována adenylací na karboxylové skupině a celá navázána na specifický ArCP protein AsuC12. Takto aktivovaný prekurzor mC₇N podjednotky vázaný na ArCP je použit jako startovací jednotka pro biosyntézu spodního polyketidového řetězce (Rui *et al.* 2010). V posledním kroku biosyntézy manumycinů je ještě mC₇N podjednotka podrobena epoxidaci nebo hydroxylaci (Obr. 10).

Biosyntéza spodního polyketidového řetězce

Spodní řetězec manumycinových antibiotik je syntetizován klasickou polyketidovou syntézou pomocí PKS II systému. Jako startovací jednotka je využívána aktivovaná 3,4-AHBA (budoucí mC₇N podjednotka) navázaná na ArCP. K prodlužování je využíván malonyl-CoA, který je pomocí MAT navázán na ACP protein AsuC12. Experimentálně bylo ověřeno, že na samotné polyketidové reakci se podílí KS I/II AsuC13 (viz. kapitola 2.2.5). U asukamycinu, manumycinu A a dalších látek, které mají trienový spodní řetězec proběhnou celkem tři opakované kondenzace malonyl-ACP (Thiericke *et al.* 1990). U colabomycinu, který má tetraenový spodní řetězec probíhá kondenzace tedy celkem čtyřikrát a u látky U-62,162 dvakrát. Po základní kondenzaci je řetězec dále upravován ketoreduktázou (AsuC7) a dvěma dehydrogenázami (AsuC8,9). Touto úpravou vzniká typická dvojná vazba na každé připojené jednotce (Obr. 10) (Rui *et al.* 2010). V případě U-62,162 lze předpokládat navíc přítomnost genu pro ER, jelikož její spodní řetězec je v celé délce satureovaný. Ke spodnímu řetězci je po ukončení polyketidové syntézy připojena C₅N podjednotka nebo zůstává zakončený karboxylovou skupinou (nisamycin, U-62,162).

Biosyntéza C₅N podjednotky

C₅N podjednotka je velmi konzervovanou strukturou manumycinových antibiotik. Stejnou strukturu lze najít i u jiných přírodních látek, jako je např. antibiotikum moenomycin (Ostash *et al.* 2007). Základním prekurzorem pro její vznik je kyselina 5-aminolevulová (5-ALA). Ta se podílí kromě formace C₅N podjednotky i v jiných důležitých biosyntetických drahách buňky, jako je např. vznik tetrapyrolových látek (hem, chlorofyl atd.). V buňce může být 5-ALA syntetizována dvěma hlavními cestami. V prvním případě se jedná o tzv. C₅ dráhu. Prekurzorem 5-ALA je v tomto případě tRNA^{glu}, která je následně přeměněna na semialdehyd a finálně transaminována na 5-ALA. Druhou možností biosyntézy je tzv. C₄ (neboli Sheminova) dráha. V té vzniká 5-ALA kondenzací sukcinyl-CoA a glycinu. Tato reakce je katalyzována enzymem 5-ALA-syntázou. C₅ dráha je typická pro rostliny a bakterie, C₄ dráha potom pro živočichy, houby a některé, hlavně fotosyntetické bakterie. V případě C₅N podjednotky manumycinových látek bylo prokázáno, že jejím prekurzorem je 5-ALA pocházející z C₄ dráhy. U producenta asukamycinu byla prokázána přítomnost obou těchto biosyntetických drah. C₅ drahou je syntetizována výhradně 5-ALA pro biosyntézu tetrapyrólů, C₄ drahou potom 5-ALA pro sestavení C₅N podjednotky (Petricek *et al.* 2006). Jelikož geny pro biosyntézu 5-ALA C₄ drahou jsou přímo součástí biosyntetického shluku asukamycinu, může být tento soubor genů nejen využíván pro efektivní vyhledávání nových manumycinových metabolitů obsahujících C₅N podjednotku z přírodních producentů, ale zároveň usnadňuje lokalizovat polohu tohoto biosyntetického shluku genů na chromozómu.

V biosyntetickém shluku asukamycinu, byly geny nutné pro syntézu C₅N podjednotky zahrnuty do skupiny D. Jedná se celkově o tři geny v jedné transkripční jednotce (Obr. 9). AsuD2 zajišťuje samotnou kondenzaci mezi sukcinyl-CoA a glycinem. Vzniklý meziprodukt (5-ALA) je dále aktivován AsuD3 (acyl-CoA-ligáza) a opět upraven pomocí AsuD2 do finální podoby C₅N podjednotky (Obr. 10) (Rui *et al.* 2010).

Biosyntéza horního polyketidového řetězce.

Horní polyketidový řetězec, je struktura, ve které jsou manumycinové látky nejvíce proměnlivé a také struktura, která nejméně moduluje např. jejich protinádorové účinky. Syntéza probíhá klasickou polyketidovou syntézou, stejně jako u řetězce spodního. Jako startovací jednotka mohou být využity různé molekuly. Manumycin A využívá jako startovací

jednotku acetyl-CoA, manumycin E 4-methylpentanyl-CoA, manumycin G 2-methylpropanyl-CoA atd. U asukamycinu je startovací jednotkou cyklohexylcarbonyl-CoA (CHC-CoA). Právě startovací jednotka horního řetězce je strukturou, ve které se často liší několik produkovaných manumycinových látek z jednoho producenta (Hu & Floss 2006). To ukazuje, že specifita enzymů zajišťujících syntézu horního polyketidového řetězce k určité startovací jednotce není stoprocentní. U horního řetězce je také využíváno větší spektrum prodlužovacích jednotek. U manumycinu A se jedná o jeden malonyl-CoA a následně třikrát metylmalonyl-CoA. U asukamycinu je to třikrát malonyl-CoA.

Do biosyntézy horního řetězce jsou u asukamycinu zapojeny dvě skupiny genů (Obr. 9). Skupina B syntetizuje startovací jednotku (CHC-CoA). Jejím prekurzorem je kyselina šikimová (Thiericke *et al.* 1990). Bylo ověřeno, že mutant v genu *asuB1* přestává produkovat asukamycin A a produkuje značně více minoritních manumycinových látek, které nevyužívají CHC-CoA startovací jednotku (Rui *et al.* 2010). *AsuC3–C9* se patrně podílejí na syntéze samotného polyketidového řetězce. Přesné zapojení těchto genů v biosyntéze horního řetězce nebylo prozatím objasněno (viz. kapitola 2.2.5).

Skládání výsledného produktu a finální úpravy molekuly

Ve finální fázi biosyntézy manumycinů jsou složeny mC_7N podjednotka s nasyntetizovaným spodním řetězcem, startovací jednotka s nasyntetizovaným horním řetězcem a C_5N podjednotka. Vzniká protoasukamycin (Obr. 10). Obě spojení jsou zajištěna amidovou vazbou, která je u asukamycinu zprostředkována pomocí *AsuD1* (připojení C_5N podjednotky ke spodnímu řetězci) a *AsuC2* (připojení horního řetězce k mC_7N podjednotce). Oba tyto geny patří do skupiny amid-syntáz a pro produkci asukamycinu jsou esenciální (Rui *et al.* 2010). Finálním krokem, po složení všech podjednotek je oxidace mC_7N podjednotky. Oxidace probíhá na dvou místech, v pozici C4 a C5–C6. Zdrojem kyslíku je atmosférický kyslík. Enzymy podílející se na této úpravě jsou tedy oxygenázy (Thiericke *et al.* 1989). Celkem tři geny zapojené do finální oxidace asukamycinu byly zahrnuty do skupiny E (Obr. 9). V prvním kroku se uplatňují *AsuE1* a *AsuE2*, které přeměňují protoasukamycin na 4-hydroxyprotoasukamycin. Ten podléhá finální epoxydaci, kterou zprostředkovává *AsuE3* (Rui *et al.* 2010). Kompletní epoxydované manumyciny (typ I) můžou dále přecházet v látky typu II. Toto je zajištěno samovolnou nebo enzymatickou redukcí kyslíku v pozici C5–C6 (Obr. 10).

Regulace biosyntézy

V biosyntetickém shluku asukamycinu bylo popsáno celkem 6 genů, které jsou zapojeny do regulace produkce asukamycinu. Jedná se o transkripční faktory, které byly shrnuty do skupiny R (Obr. 9) (Rui *et al.* 2010). U pěti z těchto genů byla popsána schopnost pozitivní regulace produkce asukamycinu. *AsuR1* a *AsuR5* jsou esenciální regulátory a v případě jejich delece je produkce asukamycinu zcela zastavena. *AsuR2*, 4 a 6 patrně regulují produkci asukamycinu na různých úrovních. V případě jejich jednotlivých delecí dochází k postupnému snižování produkce asukamycinu oproti divokému kmenu. Znalosti regulace biosyntézy asukamycinu může být použito pro zvýšení jeho produkce. Při uměle zvýšené expresi *AsuR1–R4* bylo popsáno až čtrnáctinásobné zvýšení produkce asukamycinu (Xie *et al.* 2012).

2.3 Možnosti úprav manumycinových antibiotik

Molekuly manumycinových antibiotik lišící se navzájem svojí strukturou vykazují často různé biologické aktivity. Např. manumyciny typu I a II vykazují různou antimikrobiální aktivitu (viz. kapitola 2.1.4). Pro protinádorové účinky je zase určující struktura horního řetězce atd. Cílenými úpravami manumycinových molekul by tedy mohlo být možné cíleně modulovat jejich biologické vlastnosti. Takto vylepšené biologické účinky by mohli v budoucnu vést např. k jejich klinickému využití.

Jednoduchou inzerční mutací či delecí genu, popř. genů, zapojených v určité fázi biosyntézy manumycinů, lze vytvářet mutantní látky, jejichž molekula postrádá určitou strukturu, nebo u ní dochází k celkovým strukturním změnám. Příkladem je např. vyřazení genů ze skupiny D u producenta asukamycinu. To vede k syntéze manumycinového metabolitu s horním i spodním řetězcem, ale bez C₅N podjednotky (Rui *et al.* 2010). Takto upravené látky jsou často vedlejším produktem mutačních analýz biosyntetických drah. Vyřazení určité části biosyntetické dráhy může být také použito k zablokování produkce majoritní látky a zvýšení produkce minoritních metabolitů. Příkladem je příprava mutantního kmenu *Streptomyces nodosus* ssp. *asukaensis* ΔCH, který má přerušovaný gen *asuBI*. U něho byla zcela zastavena produkce asukamycinu a zvýšena produkce minoritních kongenerů (Pospisil *et al.* 2011).

Další velmi využívanou technikou manipulace s přírodními látkami je tzv. „feeding“. Je založen na schopnosti biosyntetických enzymů akceptovat jako substrát více než jednu látku. Produkčnímu kmenu je do média přidána chemická látka podobná fyziologickému prekursoru. Výsledkem je většinou produkce jak původního metabolitu, tak malého množství upravené látky se zainkorporovaným podsunutým prekurzorem. Příkladem je např. příprava cyklopropyl-, cyklobutyl-, cyklopentyl- a cykloheptyl-asukamycinu, u kterých byla producentovi asukamycinu uměle podsunuta jiná startovací jednotka než CHC-CoA (Hu & Floss 2006). Častý problém experimentů využívajících „feeding“ je malý výtěžek mutantní látky. Je proto vhodné tuto metodu zkombinovat právě s delecí či jiným funkčním vyřazením genů pro syntézu fyziologického prekursoru.

Velmi dobrou metodou, kterou je možné získat velké množství nových derivátů původní látky je kombinatorní biosyntéza. Její podstatou je kombinace genů pro enzymy pocházejících z příbuzných nebo i zcela nepříbuzných biosyntetických drah. Pro použití metod kombinatorní biosyntézy je nutné dobré pochopení všech biosyntetických drah, které chceme navzájem skládat. Příkladem kombinatorní biosyntézy je např. provedená kombinace genů iniciačního KS III systému z producenta R1128 a minimální ActPKS (Tang *et al.* 2004) nebo kombinace minimální TcmPKS s ketoreduktázou a cyklázou pocházející z biosyntetického shluku actinorhodinu (McDaniel *et al.* 1994). Metodami kombinatorní biosyntézy by mohlo být v budoucnu možné sestavit přesně definované manumycinové metabolity (definovaná délka a struktura řetězců, struktura mC₇N podjednotky atd.). Při dokonalém pochopení vlivu jednotlivých struktur manumycinových antibiotik na jejich biologickou aktivitu, by tak bylo možné cíleně modulovat jejich využitelné účinky.

Prozatím nepřilíš prozkoumanou možností je cílená chemická úprava manumycinových látek. Bylo např. prokázáno, že manumycinové produkty oxidativní degradace, u kterých byl odštěpen spodní polyketidový řetězec stále vykazují silnou aktivitu inhibice Ras-farnesyltransferázy. Přitom jsou však tyto látky mnohem stabilnější než původní manumyciny (Kapfer *et al.* 1996). Některé z manumycinových látek (manumycin A, alisamycin atd.) byly v minulosti kromě bakteriální produkce také kompletně připraveny chemickou syntézou (Alcaraz *et al.* 1996, Alcaraz *et al.* 1999). Další chemické úpravy manumycinových molekul, jako např. jejich halogenace nebo oxidace, by teoreticky mohly vést k dalšímu posílení jejich biologických účinků nebo k objevení zcela nových aktivit.

3. Materiál a metody

3.1. Materiál

3.1.1 Bakteriální kmeny

***Escherichia coli* XL1-Blue** (Bullock *et al.* 1987)

Kmen poskytl: Ing. Miroslav Petříček, CSc. (Laboratoř molekulární biologie aktinomycet, MBÚ AV ČR, v.v.i)

Kultivační podmínky: kmen byl kultivován aerobně v LB tekutém médiu při 37 °C na třepačce při 220 rpm nebo na agarovém LA médiu při 37 °C.

Kmen byl využit pro klonovací aplikace využívající plasmidové vektory. Poskytuje možnost tzv. „modro-bílé“ selekce (na základě přítomnosti funkční β -galaktozidázy) a je rezistentní k tetracyklinu. Postrádá gen pro endonukleázu (*endA*), což zlepšuje kvalitu izolované DNA z těchto buněk.

***Escherichia coli* GM2929** (Palmer & Marinus 1994)

Kmen poskytla: Mgr. Petra Rampírová (Laboratoř molekulární biologie aktinomycet, MBÚ AV ČR, v.v.i)

Kultivační podmínky: kmen byl kultivován aerobně v LB tekutém médiu při 37 °C na třepačce při 220 rpm nebo na agarovém LA médiu při 37 °C.

Kmen má deletované geny pro metylázy (*dam* a *dcm*). Byl využit k produkci kyvadlových vektorů, které byly dále transformovány do bakterií rodu *Streptomyces*.

***Streptomyces nodosus* ssp. *asukaensis* (*asuC13* ::*apr*^R)** (Rui *et al.* 2010)

Kmen poskytl: Ing. Miroslav Petříček, CSc. (Laboratoř molekulární biologie aktinomycet, MBÚ AV ČR, v.v.i)

Kultivační podmínky: kmen byl kultivován aerobně v tekutém YEME, popř. GYM médiu (v prolamovaných Erlenmayerových baňkách nebo širokých zkumavkách) s apramycinem při 28 °C na třepačce při 220 rpm nebo na agarovém MH, popř. GYM médiu s apramycinem při 28 °C.

Mutantní kmen odvozený od přírodního producenta asukamycinu *Streptomyces nodosus* ssp. *asukaensis*. Kmen nese v chromozómu přerušení genu *asuC13* (v oblasti *Bcl* I – *Mlu* I) v biosyntetickém shluku asukamycinu genovou kazetou obsahující gen pro rezistenci k apramycinu (*aac(3)IV*) (Obr. 17). Byl využit pro přípravu mutantního kmenu *Streptomyces nodosus* ssp. *asukaensis* Δ *asuC13*–*C14*.

Bacillus subtilis (Difco™, BD)

Kmen poskytl: Ing. Stanislav Pospíšil, CSc. (Laboratoř molekulární biologie aktinomycet, MBÚ AV ČR, v.v.i)

Kultivační podmínky: kmen byl kultivován aerobně v tekutém TSB médiu při 37 °C na třepačce při 220 rpm (po 24 hodinách vzniká čistá suspenze endospor) nebo na nutrient agaru při 37 °C.

Kmen byl využit pro biologický test přítomnosti antimikrobiálních látek. Jedná se o gram-pozitivní bakterie, tudíž je kmen dobře využitelný pro detekci přítomnosti manumycinových antibiotik (viz. kapitola 2.1.4). Jedná se o bakterie tvořící endospory, lze je jednoduše uchovávat ve formě suspenze endospor po velmi dlouhou dobu při 4 °C.

3.1.2 Vektory

pTZ19R (Mead *et al.* 1986)

Vektor poskytl: Ing. Miroslav Petříček, CSc. (Laboratoř molekulární biologie aktinomycet, MBÚ AV ČR, v.v.i)

Plasmid použitý pro přípravu neradioaktivně značené DNA próby (v *E. coli*). Nese gen pro rezistenci k ampicilinu (*bla*) a gen kódující α -fragment β -galaktozidázy (*lacZ*), v jehož sekvenci se nachází mnohočetné klonovací místo (MCS – Multiple Cloning Site), což umožňuje tzv. „modro-bílou“ selekci přítomnosti rekombinantních plasmidů (Obr. 11).

pMQ06

Vektor poskytl: Ing. Miroslav Petříček, CSc. (Laboratoř molekulární biologie aktinomycet, MBÚ AV ČR, v.v.i)

Plasmid použitý pro vytvoření „in-frame“ delece v oblasti genů *asuC13–C14* v biosyntetickém shluku asukamycinu. Je odvozený od pTZ19R, obsahuje vložený fragment *Pst* I – *Bam*H I z biosyntetického shluku asukamycinu (Obr. 12).

pGM160 (Muth *et al.* 1989)

Vektor poskytl: Ing. Miroslav Petříček, CSc. (Laboratoř molekulární biologie aktinomycet, MBÚ AV ČR, v.v.i)

Kyvadlový vektor pro *E. coli* a bakterie rodu *Streptomyces* použitý k homologní rekombinaci. Nese gen pro rezistenci k ampicilinu (*bla*) pro selekci v *E. coli* a k thiostreptonu (*tsr*) pro selekci ve streptomycetách (Obr. 11). Plasmid má teplotně senzitivní replikační počátek pro replikaci ve streptomycetách. Replikuje se při teplotě 28–30 °C, při teplotě 37–39 °C (netolerantní teplota pro replikaci) dochází k integraci homologních úseků DNA, klonovaných do tohoto vektoru, mechanismem homologní rekombinace do bakteriálního chromozómu.

pIJ622 (Kieser – nepublikovaná data)

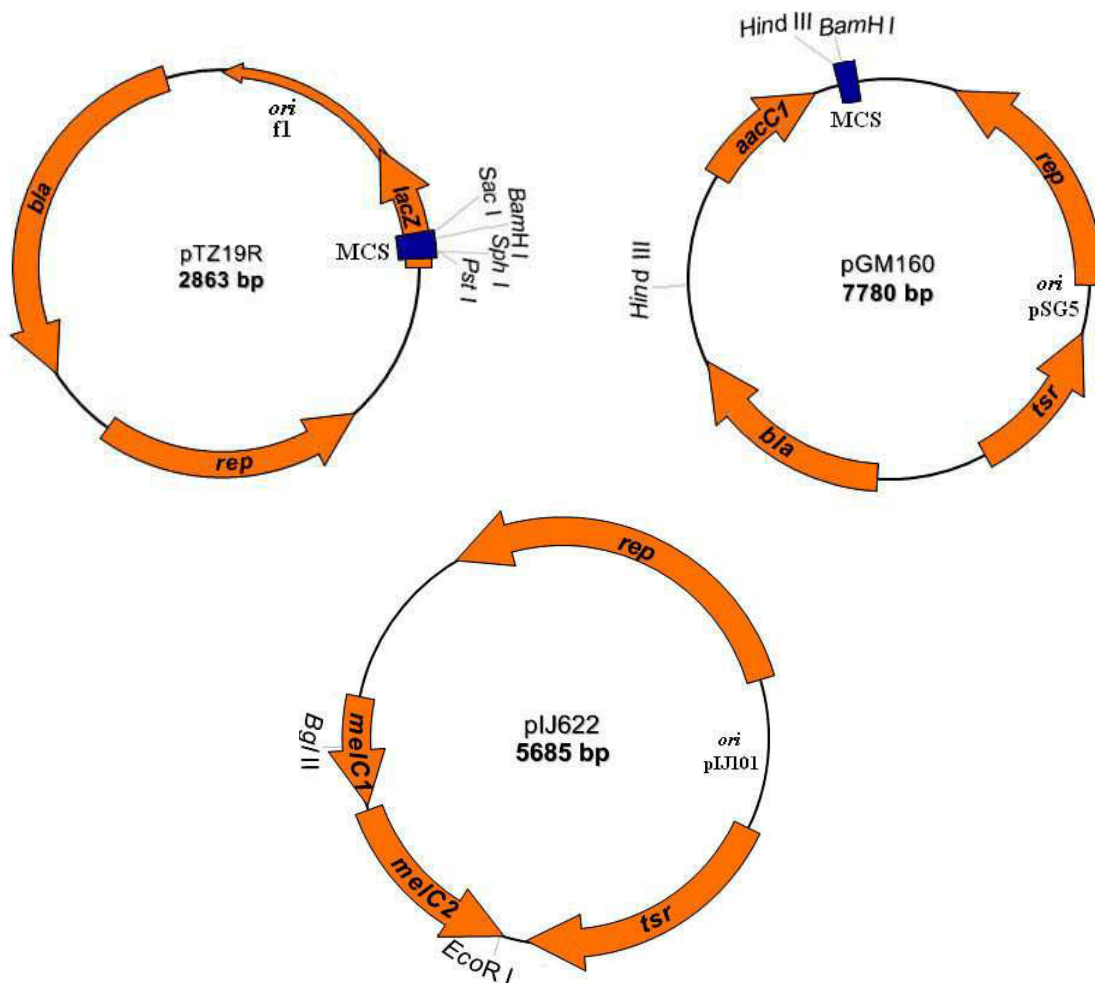
Vektor poskytl: Ing. Miroslav Petříček, CSc. (Laboratoř molekulární biologie aktinomycet, MBÚ AV ČR, v.v.i)

Streptomycetový vektor odvozený od plasmidu pIJ702 (Katz *et al.* 1983) obsahující *Eco*R I restriční místo (namísto *Bcl* I u pIJ702). Byl použit jako negativní kontrola při transformaci vektorů do „in-frame“ mutanta *Streptomyces nodosus* ssp. *asukaensis* Δ *asuC13–asuC14*. Nese gen pro rezistenci k thiostreptonu (*tsr*) (Obr. 11).

pASU-ASU, pCOL-COL, pASU-COL, pCOL-ASU, pMAN-MAN, pASU(kan^R), pCOL(apr^R)

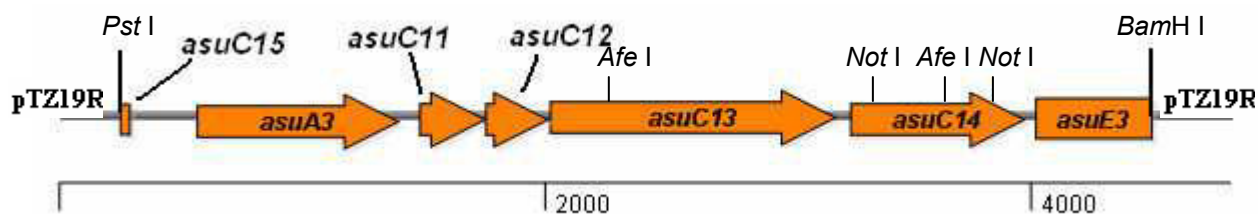
Vektory poskytl: Ing. Miroslav Petříček, CSc. (Laboratoř molekulární biologie aktinomycet, MBÚ AV ČR, v.v.i)

Sada plasmidů odvozených od vektoru pIJ622. Plasmidy obsahují vložený konstitutivní ermE* promotor (Bibb *et al.* 1985) a hned za ním vloženou kazetu genů pro ACP, β -ketoacylsyntázu I/II a potenciální CLF z přírodních producentů asukamycinu (*Streptomyces nodosus* ssp. *asukaensis*), colabomycinu E (*Streptomyces* SOK1/5-4) a manumycinu A (*Streptomyces parvulus* Tü64) (Obr. 13).

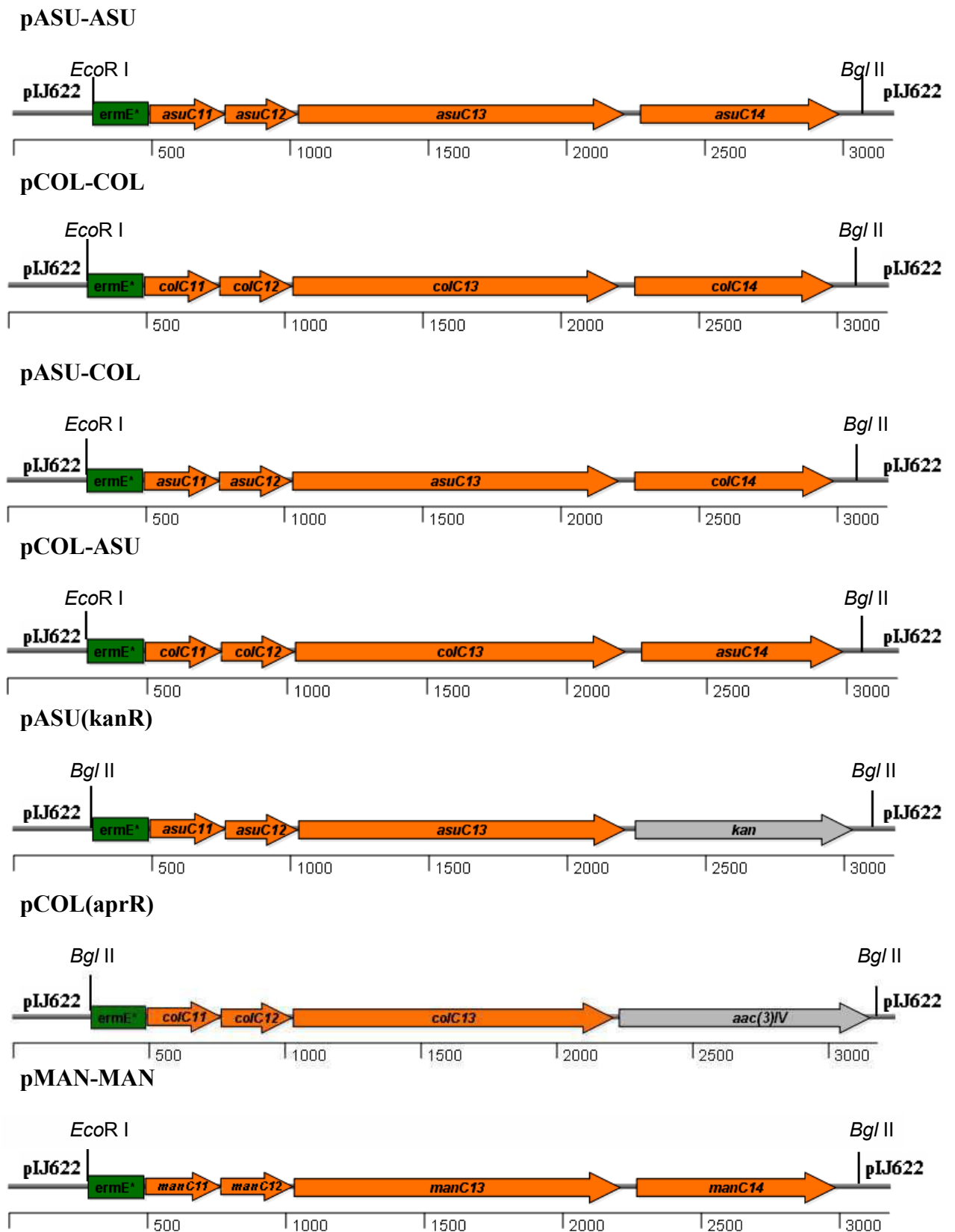


Obr. 11: Plasmidy pTZ19R, pGM160 a pIJ622 s vyznačenou velikostí, replikačními počátky, nesenými geny a restrikčními místy použitými v této práci. MCS = mnohočetné klonovací místo, *bla* = gen pro rezistenci k ampicilinu, *tsr* = gen pro rezistenci k thioestreptonu, *rep* = gen pro plasmidový replikační protein, *lacZ* = gen pro α -fragment β -galaktozidázy, *aacC1* = gen pro rezistenci ke gentamicinu, *melC1* = gen pro chaperon tyrozinázy MelC2, *melC2* = gen pro tyrozinázu (pocházející z melaninového operonu *Streptomyces antibioticus*).

pMQ06



Obr. 12: Plasmid pMQ06. Vyznačená oblast vložené kazety genů z biosyntetického shluku asukamycinu a místa jejího vložení do vektoru pTZ19R. Měřítko ukazuje velikost v bp.



Obr. 13: Plasmidy pASU-ASU, pCOL-COL, pASU-COL, pCOL-ASU, pASU(kan^R), pCOL(apr^R) a pMAN-MAN. Vložené kazety genů a místa jejich vložení do vektoru pIJ622. Měřítka ukazují velikost v bp. Geny *asu/col/manC11* a *C12* jsou geny pro ACP proteiny, *asu/col/manC13* jsou geny pro β -ketoacylsyntázu I/II, *asu/col/manC14* jsou geny pro potenciální CLF, *kan* označuje gen pro kanamycinovou rezistenci, *aac(3)IV* označuje gen pro apramycinovou rezistenci.

3.1.3 DNA vzorky a próby

Chromozomální DNA – *Streptomyces nodosus* ssp. *asukaensis*:

DNA poskytl: Ing. Miroslav Petříček, CSc. (Laboratoř molekulární biologie aktinomycet, MBÚ AV ČR, v.v.i)

Koncentrace DNA: 0,6 µg/ml

Chromozomální DNA izolovaná z divokého kmenu *Streptomyces nodosus* ssp. *asukaensis* (Omura *et al.* 1976).

DNA próba „Gene Ruler“:

Próbu poskytla: Mgr. Kateřina Petříčková, PhD. (Laboratoř molekulární biologie aktinomycet, MBÚ AV ČR, v.v.i)

Neradioaktivně značená DNA próba připravená standardní metodou (viz. kapitola 3.2.2). Jako templátová DNA pro značení byl použit DNA velikostní standard (viz. kapitola 3.1.6).

3.1.4 Kultivační média

Tekutá kultivační média

LB (Luria–Bertani) médium:

10 g trypton (Tryptone, Oxoid)

5 g kvasničný extrakt (Yeast Extract, Oxoid)

5 g NaCl

doplnit do 1000 ml dH₂O

pH 7,2–7,4 (k úpravě byly použity 2M vodné roztoky HCl nebo NaOH)

sterilizujeme v autoklávu (121 °C, 23 min., 101,5 kPa)

SOC médium:

4 g trypton (Tryptone, Oxoid)

1 g kvasničný extrakt (Yeast Extract, Oxoid)

116 mg NaCl

38 mg KCl

doplnit do 200 ml dH₂O

pH 6,9–7,1 (k úpravě byly použity 2M vodné roztoky HCl nebo NaOH)

sterilizujeme v autoklávu (121 °C, 23 min., 101,5 kPa)

po sterilizaci přidáme:

2 ml Mg²⁺ roztok (1M MgCl₂·6H₂O a 1M MgSO₄·7H₂O) – sterilní

2 ml glukózový roztok (2M D-glukóza) – sterilní

Produkční médium

20 g glukóza

5 g pepton (Neutralised Bacteriological Peptone, Oxoid)

0,25 g K₂HPO₄

0,5 g MgSO₄·5H₂O

1 ml stopové prvky 1

doplníme do 1000 ml dH₂O

pH 7,0 (k úpravě byly použity 2M vodné roztoky HCl nebo NaOH)

sterilizujeme v autoklávu (121 °C, 23 min., 101,5 kPa)

stopové prvky 1:

5 g $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

50 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

5 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

5 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

10 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

doplnit do 1000 ml dH_2O , skladujeme v tmavé lahvi

YEME médium

3 g kvasničný extrakt (Yeast Extract, Oxoid)

5 g pepton (Neutralised Bacteriological Peptone, Oxoid)

3 g sladový extrakt (Malt Extract, Oxoid)

10 g glukóza

340 g sacharóza

doplnit do 1000 ml dH_2O

pH 7,2 (k úpravě byly použity 2M vodné roztoky HCl nebo NaOH)

sterilizujeme v autoklávu (121 °C, 23 min., 101,5 kPa)

po sterilizaci přidáme:

2 ml 2,5M MgCl_2 – sterilní

25 ml 20% glycin (w/v) – sterilní – **pouze pro přípravu protoplastů!**

GYM médium

4 g glukóza

4 g kvasničný extrakt (Yeast Extract, Oxoid)

10 g sladový extrakt (Malt Extract, Oxoid)

1 g NZ amin A (NZ Amine[®] Type A, Wako)

2 g NaCl

3 ml OB soli

doplnit do 1000 ml dH_2O

pH 7,3 (k úpravě byly použity 2M vodné roztoky HCl nebo NaOH)

sterilizujeme v autoklávu (121 °C, 23 min., 101,5 kPa)

OB soli:

0,166 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

0,25 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0,12 g $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

0,5 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

0,3 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

doplnit do 100 ml dH_2O , skladujeme v tmavé lahvi

TSB médium:

30 g směs trypton – sojová mouka (Tryptone Soya Broth, Oxoid)

doplnit do 1000 ml dH_2O

sterilizujeme v autoklávu (121 °C, 23 min., 101,5 kPa)

Kutlivační média s agarem

LB agarové médium (LA médium):

1000 ml LB média (nesterilizovaného)
20 g agar (Agar Bacteriological, Oxoid)
sterilizujeme v autoklávu (121 °C, 23 min., 101,5 kPa)

GYM agarové médium

1000 ml GYM média (nesterilizovaného)
20 g agar (Agar Bacteriological, Oxoid)
sterilizujeme v autoklávu (121 °C, 23 min., 101,5 kPa)

MH médium

10 g sladový extrakt (Malt Extract, Oxoid)
4 g kvasničný extrakt (Yeast Extract, Oxoid)
4 g glukóza
20 g agar (Agar Bacteriological, Oxoid)
doplnit do 1000 ml dH₂O
pH 7,3 (k úpravě byly použity 2M vodné roztoky HCl nebo NaOH)
sterilizujeme v autoklávu (121 °C, 23 min., 101,5 kPa)

R5 médium

103 g sacharóza
0,25 g K₂SO₄
10,12 g MgCl₂·6H₂O
10 g glukóza
0,1 g kyselý kaseinový hydrolyzát (Casein – Acid Hydrolysate Type I, Sigma)
2 ml stopové prvky 2
5 g kvasničný extrakt (Yeast Extract, Oxoid)
5,73 g TES
22 g agar (Agar Bacteriological, Oxoid)
doplnit do 1000 ml dH₂O
sterilizujeme v autoklávu (121 °C, 23 min., 101,5 kPa)

po sterilizaci přidáme:

10 ml 0,5% KH₂PO₄ (w/v) – sterilní
4 ml 5M CaCl₂ – sterilní
15 ml 20% L-prolin (w/v) – sterilní
7 ml 1M NaOH – sterilní

stopové prvky 2:

40 mg ZnCl₂
200 mg FeCl₃·6H₂O
10 mg CuCl₂·2H₂O
10 mg MnCl₂·4H₂O
10 mg Na₂B₄O₇·10H₂O
10 mg (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O
doplníme do 1000 ml dH₂O, skladujeme v tmavé lahvi

Nutrient agar:

23 g nutrient agar (Difco™ Nutrient Agar, BD)
doplnit do 1000 ml dH₂O
sterilizujeme v autoklávu (121 °C, 23 min., 101,5 kPa)

3.1.5 Roztoky přidávané do médií

Ampicilin:

zásobní roztok ampicilinu: 100 mg/ml (rozpuštěno ve sterilní dH₂O)
skladujeme v -20 °C
použitá výsledná koncentrace v médiu: 100 µg/ml

Thiostrepton:

zásobní roztok thiostreptonu: 30 mg/ml (rozpuštěno v DMSO)
skladujeme v -20 °C
použitá výsledná koncentrace v médiu: 30 µg/ml

Apramycin (Apr):

zásobní roztok apramycinu: 100 mg/ml (rozpuštěno ve sterilní dH₂O)
skladujeme v -20 °C
použitá výsledná koncentrace v médiu: 25 µg/ml

IPTG (izopropyl-β-D-1-thiogalactopyranozid):

zásobní roztok IPTG: 1M IPTG (rozpuštěno ve sterilní dH₂O)
skladujeme v -20 °C
použitá výsledná koncentrace v médiu: 0,5mM

X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranozid):

zásobní roztok X-gal: 40 mg/ml (rozpuštěno v N,N-dimethylformamidu)
skladujeme v -20 °C
použitá výsledná koncentrace v médiu: 40 µg/ml

3.1.6 DNA oligonukleotidy a velikostní standardy

DNA oligonukleotidy:

použité oligonukleotidy (Generi Biotech):

A31-F1:

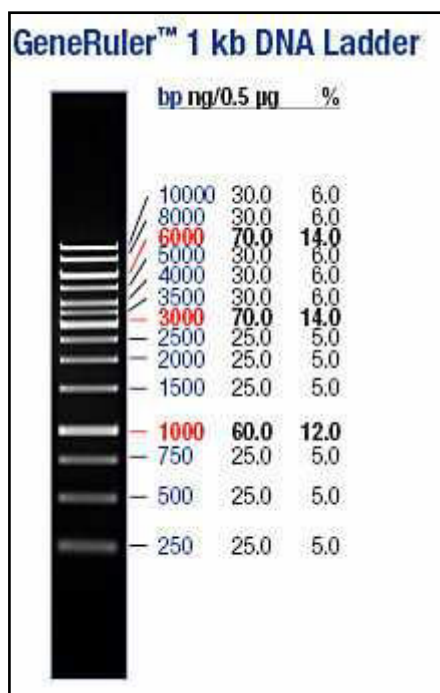
5' – GCA TGG CGA TCA CCG GCT ACG GAG – 3'

LCFACAL:

5'– TCG GAT CTG ATG TCT CTC TCG GTG G – 3'

DNA velikostní standard:

GeneRuler™ 1kb DNA Ladder, Ready-to-Use 250 to 10000 bp, Thermo Scientific (Obr. 14)



Obr. 14: Použitý velikostní standart pro agarózovou DNA elektroforézu (GeneRuler™ 1kb DNA Ladder, Ready-to-Use 250 to 10000 bp, Thermo Scientific).

Převzato z: <http://www.thermoscientificbio.com/nucleic-acid-electrophoresis/generuler-1-kb-dna-ladder-ready-to-use-250-to-10000-bp>

3.1.7 Protilátky a enzymy

AP-konjugát:

Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments (150 U, 200 µl), Roche

RNáza A:

zásobní roztok RNázy A: 1 mg/ml (rozpuštěno ve sterilní dH₂O)

zásobní roztok 10 min. povaříme při 100 °C

skladujeme v -20 °C

DNA ligáza:

T4 DNA ligase (5 U/µl), Thermo Scientific

Klenow fragment:

Klenow Fragment (10 U/µl), Thermo Scientific

Restrikční endonukleázy:

použité restrikční endonukleázy (Thermo Scientific): *Hind* III, *Bam*H I, *Afe* I, *Not* I, *Nco* I, *Sph* I, *Mlu* I, *Sac* I, *Eco*R I, *Bgl* II

aktivita: 10 U/µl

3.1.8 Pufry a roztoky

TE pufr:

10mM Tris-HCl (pH 8,0)
1mM EDTA (pH 8,0)
autoklávuje (121 °C, 23 min., 101,5 kPa)

TESLR pufr:

25mM Tris-HCl (pH 8,0)
25mM EDTA (pH 8,0)
0,3M sacharóza
autoklávuje (121 °C, 23 min., 101,5 kPa)

před každým použitím přidáme:

2 mg/ml lysozym
1 µl/ml zásobní roztok RNázy A

NaOH/SDS:

0,3M NaOH
2% SDS (w/v)
skladujeme v plastové nádobě

100mM spermin:

100mM spermin
pH 7,5 (k úpravě byla použit 2M vodný roztok HCl)
sterilizujeme filtrací

Kyselý fenol/chloroform:

5 g fenol
1 ml chloroform
5 ml dH₂O
5 mg 8-hydroxychinolin
skladujeme při 4 °C v tmavé lahvi

Neutrální fenol/chloroform:

Roztok kyselého fenol/chloroformu vytřepeme 10 min. s polovičním objemem 1M Tris-HCl (pH 8,8), necháme ustát a odstraníme horní vodnou fázi. Dále vytřepeme s polovičním objemem 0,1M Tris-HCl (pH 8,0) 10 min., necháme ustát a odstraníme většinu horní vodné fáze.

Składujeme při 4 °C v tmavé lahvi.

STET pufr:

8% sacharóza (w/v)
5% triton X-100 (w/v)
50mM EDTA (pH 8,0)
50mM Tris-HCl (pH 8,0)
autoklávuje (121 °C, 23 min., 101,5 kPa)

před každým použitím přidáme:

0,66 mg/ml lysozym

2mM dNTP:

2mM dATP

2mM dTTP

2mM dGTP

2mM dCTP

rozpouštíme ve sterilní dH₂O, skladujeme v -20 °C

Systém pufrů pro restrikční endonukleázy, Thermo Scientific:

10x koncentrovaný pufr B:

výsledná koncentrace: 10mM Tris-HCl (pH 7,5 při 37 °C), 10mM MgCl₂, 0,1 mg/ml BSA

10x koncentrovaný pufr G:

výsledná koncentrace: 10mM Tris-HCl (pH 7,5 při 37 °C), 10mM MgCl₂, 0,1 mg/ml BSA,
50mM NaCl

10x koncentrovaný pufr O:

výsledná koncentrace: 50mM Tris-HCl (pH 7,5 při 37 °C), 10mM MgCl₂, 0,1 mg/ml BSA,
100mM NaCl

10x koncentrovaný pufr R:

výsledná koncentrace: 10mM Tris-HCl (pH 7,5 při 37 °C), 10mM MgCl₂, 0,1 mg/ml BSA,
100mM KCl

10x koncentrovaný pufr Tango:

výsledná koncentrace: 33mM Tris-acetát, 10mM octan hořečnatý, 66mM octan draselný,
0,1 mg/ml BSA

10x koncentrovaný T4 DNA ligační pufr (10x T4 DNA Ligase Buffer), Thermo Scientific:

400mM Tris-HCl, 100mM MgCl₂, 100mM DTT, 5mM ATP (pH 7,8 při 25 °C)

10x koncentrovaný Klenow pufr (10x Klenow Buffer), Thermo Scientific:

500mM Tris-HCl (pH 8,0 při 25 °C), 50mM MgCl₂, 10mM DTT

Komerční sada pro přípravu DNA neradioaktivně značené sondy: DIG DNA Labeling Kit, Roche:

dNTP značící směs (dNTP Labeling Mixture) – 10x koncentrovaná směs dNTP
(1mM dATP, 1mM dCTP, 1mM dGTP, 0,65mM dTTP, 0,35mM Dig-dUTP)

Hexanukleotidová směs (Hexanucleotide Mix) – 10x koncentrovaná směs náhodných
hexanukleotidů

Klenow enzym (Klenow enzyme) – Klenow enzym 2 U/μl

Komerční sada pro PCR: GC-RICH PCR System, Roche:

GC-RICH enzymová směs (GC-RICH Enzyme Mix, in storage buffer)

5x koncentrovaný GC-RICH reakční pufr (GC-RICH Reaction Buffer, 5x) – obsahuje
7,5mM MgCl₂ a DMSO

GC-RICH rozkladný roztok (GC-RICH Resolution Solution, 5M)

Komerční sada pro izolaci chromozomální DNA ze streptomycet: Wizard® Genomic DNA Purification Kit, Promega:

Cell Lysis Solution

Nuclei Lysis Solution

Protein Precipitation Solution

RNase Solution – RNáza A 4 mg/ml (rozpuštěno v DNA Rehydration Solution)

DNA Rehydration Solution – 10mM Tris-HCl (pH 7,4), 1mM EDTA (pH 8,0)

všechny roztoky skladujeme při pokojové teplotě

Komerční sada pro izolaci plasmidové DNA z *E.coli*: JETQUICK Plasmid Miniprep Spin Kit, Genomed:

G1 (Cell Suspension) – 50mM Tris-HCl, 10mM EDTA, 100 µg/ml RNáza A, skladujeme při 4 °C

G2 (Cell Lysis) – 200mM NaOH, 1% SDS (w/v), skladujeme při pokojové teplotě

G3 (Neutralization/Binding) – obsahuje octan a guanidin hydrochlorid, skladujeme při pokojové teplotě

G4 (Wash) – obsahuje etanol, NaCl, EDTA, Tris-HCl, skladujeme při pokojové teplotě

GX (Wash) – obsahuje octan, guanidin hydrochlorid, EDTA, etanol, skladujeme při pokojové teplotě

NEW WASH promývací roztok:

100mM NaCl

1mM EDTA

50% etanol (v/v)

10mM Tris-HCl (pH 7,5)

Roztok NaI:

Rozpustíme asi 0,45 kg NaI v 250 ml dH₂O, pufrujeme roztokem 20mM Trisu do pH 7,5. Přefiltrujeme a přidáme 1 g Na₂SO₃. Skladujeme v tmavé lahvi při 4 °C.

Glass milk (skelné mléko):

400 g skelného prachu resuspendujeme v dvoulitrové lahvi v 800 ml dH₂O, mícháme 60 min. a poté necháme 90 min. stát. Supernatant centrifugujeme 10 min. při 6000 rpm a pokojové teplotě (RC5C, rotor GS3, Sorvall), sediment resuspendujeme v 200–300 ml dH₂O. Přidáme HNO₃ do 50% koncentrace (v/v), přivedeme téměř k varu a zchladíme. Sediment 4–6x promyjeme dH₂O (neutralizujeme na pH 7,0). Skladujeme jako 50% (v/v) suspenzi v dH₂O při -80 °C (pro práci uchováváme v malém objemu při 4 °C).

50x koncentrovaný TAE pufr (zásobní roztok TAE pufru pro agarózovou elektroforézu):

2M Tris

1M kyselina octová

50mM EDTA (pH 8,0)

6x koncentrovaný nanášecí vzorkový pufr pro agarózovou elektroforézu:

0,25% bromfenolová modř (w/v)

30% glycerol (w/v)

5x TAE pufr

Depurinační roztok pro „Southern blotting“:

0,25M HCl

Denaturační roztok pro „Southern blotting“:

1,5M NaCl

0,5M NaOH

Neutralizační roztok pro „Southern blotting“:

1M Tris

2M NaCl

pH 7,5 (k úpravě byly použity 2M vodné roztoky HCl nebo NaOH)

20x SSC (transferový roztok) pro Southern blotting“:

3M NaCl

0,3M citronan sodný

pH 7,0 (k úpravě byly použity 2M vodné roztoky HCl nebo NaOH)

autoklávuje (121 °C, 23 min., 101,5 kPa)

Hybridizační roztok:

5x SSC

0,5% blokovací činidlo (Blocking Reagent, Roche) (w/v)

0,1% N-laurylsarcosin, sodná sůl (w/v)

0,02% SDS (w/v)

rozpuštění 1 hodinu při 70 °C

Promývací roztok 1 pro hybridizaci:

2x SSC

0,1% SDS (w/v)

Promývací roztok 2 pro hybridizaci:

0,1x SSC

0,1% SDS (w/v)

Puf 1 pro imunologickou detekci:

100mM Tris

150mM NaCl

pH 7,5 (k úpravě byla použita koncentrovaná HCl)

Puf 2 pro imunologickou detekci:

Rozpustíme blokovací činidlo (Blocking Reagent, Roche) v pufru 1 pro imunologickou detekci, aby výsledná koncentrace byla 0,5% (w/v). Rozpuštění 1 hodinu při 70 °C.

Puf 3 pro imunologickou detekci:

100mM Tris

100mM NaCl

50mM MgCl₂

pH 9,5 (k úpravě byl použit 2M roztok HCl)

Barvicí roztok pro imunologickou detekci:

k 10 ml pufru 3 pro imunologickou detekci přidáme:

45 µl NBT-roztok: 75 mg/ml nitroblue-tetrazoliová sůl v 70% (v/v) dimethylformamidu
(uchováváme v -20 °C)

35 µl X-fosfát: 50 mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl fosfátu (toluidinová sůl)
v dimethylformamidu (uchováváme v -20 °C)

P pufr (protoplastový pufr):

10,3 g sacharóza

0,025 g K₂SO₄

0,202 g MgCl₂

0,2 ml stopové prvky 2 (viz. R5 médium, kapitola 3.1.3)

doplníme do 80 ml dH₂O

sterilizujeme v autoklávu (121 °C, 23 min., 101,5 kPa)

po sterilizaci přidáme:

1 ml 0,5% KH₂PO₄ (w/v) – sterilní

10 ml 3,68% CaCl₂ (w/v) – sterilní

10 ml 5,73% TES (w/v) – sterilní

kompletní P pufr skladujeme ve 4 °C

L pufr (lytický pufr):

100 ml 10,3% sacharóza (w/v) – sterilní

10 ml 5,73% TES (w/v) – sterilní

1 ml 2,5% K₂SO₄ (w/v) – sterilní

0,2 ml stopové prvky 2 (viz. R5 médium, kapitola 3.1.3) – sterilní

1 ml 0,5% KH₂PO₄ (w/v) – sterilní

0,1 ml 2,5M MgCl₂·6H₂O – sterilní

1 ml 0,25M CaCl₂ – sterilní

skladujeme ve 4 °C

před každým použitím přidáme:

1 mg/ml lysozym

T pufr (transformační pufr):

25 ml 10,3% sacharóza (w/v)

75 ml dH₂O

0,2 ml stopové prvky 2 (viz. R5 médium, kapitola 3.1.3)

1 ml 2,5% K₂SO₄ (w/v)

sterilizujeme v autoklávu (121 °C, 23 min., 101,5 kPa)

po sterilizaci přidáme k 9,3 ml roztoku:

0,2 ml 5M CaCl₂ – sterilní

0,5 ml pufr Tris-maleinová kyselina (1M Tris, pH upravíme na hodnotu 8,0 pomocí maleinové kyseliny) – sterilní

3 ml takto připraveného roztoku přendáme do nádoby s 1 g sterilního PEG 1000.

Kompletní T pufr skladujeme ve 4 °C

3.2 Metody

3.2.1 Metody izolace DNA

Izolace chromozomální DNA ze streptomycet: Wizard® Genomic DNA Purification Kit, Promega:

1. 10 ml YEME nebo GYM média (s přidavkem příslušného antibiotika) zaočkujeme sporami a inkubujeme na třepačce při 28 °C, 220 rpm 2–4 dny (dokud se neobjeví specifický zákal).
2. 1,5 ml narostlé kultury přendáme do 1,5ml mikrozkušavky, centrifugujeme 2min. při maximální rychlosti (13000–16000 x g) a pokojové teplotě na stolní minicentrifuze (Microspin 24S, Sorvall), pipetou odstraníme supernatant. Tento postup opakujeme, dokud nezískáme asi 150–200 µl sedimentovaných buněk.
3. Buňky důkladně resuspendujeme ve 480 µl 50mM EDTA.
4. Přidáme 0,6 mg lysozymu rozpuštěného ve 120 µl 50mM EDTA. Inkubujeme 10 min. při 37 °C.
5. Centrifugujeme 2 min. na stolní minicentrifuze při maximální rychlosti a pokojové teplotě, pipetou odstraníme supernatant a přidáme 600 µl roztoku Nuclei Lysis Solution. Opatrně resuspendujeme pomocí pipety a převrácení mikrozkušavky.
6. Inkubujeme 5 min. při 80 °C, poté necháme zchladnout na pokojovou teplotu.
7. Přidáme 3 µl roztoku RNase Solution. Zamícháme důkladně převrácením mikrozkušavky.
8. Inkubujeme 45–60 min. při 37 °C, poté necháme zchladnout na pokojovou teplotu.
9. Přidáme 200 µl roztoku Protein Precipitation Solution, důkladně zamícháme (vortex).
10. Inkubujeme 5 min. v ledu, poté centrifugujeme 3 min. na stolní minicentrifuze při maximální rychlosti a pokojové teplotě.
11. Supernatant přendáme do nové mikrozkušavky obsahující 600 µl izopropanolu pokojové teploty.
12. Mícháme převrácením mikrozkušavky, dokud se neobjeví vláknitá sraženina.
13. Centrifugujeme 2 min. na stolní minicentrifuze při maximální rychlosti a pokojové teplotě.
14. Supernatant vylijeme, přidáme 600 µl 75% etanolu (v/v) pokojové teploty, opatrně několikrát promícháme převrácením mikrozkušavky.
15. Centrifugujeme 2 min. na stolní minicentrifuze při maximální rychlosti a pokojové teplotě.
16. Supernatant vylijeme, mikrozkušavku necháme vysušit na čistém absorpčním papíru asi po dobu 10–15 min.
17. Přidáme 100 µl DNA Rehydration Solution, sraženou DNA rozpouštíme 1 hodinu při teplotě 65 °C.
18. Izolovanou DNA skladujeme při 4 °C.

Izolace plasmidové DNA ze streptomycet alkalickou lyzí a fenolovou precipitací : (Kieser *et al.* 2000)

1. 10 ml YEME nebo GYM média s přidavkem příslušného antibiotika zaočkujeme sporami a inkubujeme na třepačce při 28 °C, 220 rpm 2–4 dny (dokud se neobjeví specifický zákal).
2. 1,5 ml narostlé kultury přendáme do 1,5ml mikrozkušavky, centrifugujeme 2 min. na stolní minicentrifuze (Microspin 24S, Sorvall) při maximální rychlosti

- (13000–16000 x g) a pokojové teplotě, pipetou odstraníme supernatant. Tento postup opakujeme, dokud nezískáme asi 250–300 µl sedimentovaných buněk.
3. Buňky resuspendujeme v 500 µl kompletního TESLR pufru. Inkubujeme 30 min. při 37 °C, občas promícháme. Poté necháme zchladnout na pokojovou teplotu.
 4. Přidáme 250 µl NaOH/SDS a ihned důkladně promícháme (vortex).
 5. Inkubujeme 15 min. při 70 °C, občas důkladně promícháme (vortex). Poté necháme zchladnout na pokojovou teplotu.
 6. Přidáme 80 µl kyselého fenol/chloroformu, důkladně promícháme (vortex).
 7. Centrifugujeme 10 min. na stolní centrifuze při 11000 x g a 4 °C (Centrifuge 5415R, Eppendorf).
 8. Supernatant přeneseme do nové mikrozkuhavky obsahující 50 µl nepufrovaného 3M octanu sodného a 450 µl izopropanolu. Promícháme převrácením mikrozkuhavky.
 9. Centrifugujeme 10 min. na stolní centrifuze při 11000 x g a 4 °C (Centrifuge 5415R, Eppendorf). Pipetou odstraníme veškerou tekutinu.
 10. Precipitát rozpustíme v 70 µl TE pufru.
 11. Přidáme 14 µl nepufrovaného 3M octanu sodného a 14 µl kyselého fenol/chloroformu, důkladně promícháme (vortex). Vychladíme v ledu.
 12. Centrifugujeme 10 min. na stolní centrifuze při 11000 x g a 4 °C (Centrifuge 5415R, Eppendorf).
 13. Horní vodnou fázi přeneseme do nové mikrozkuhavky obsahující 56 µl nepufrovaného 3M octanu sodného a 630 µl TE pufru. Přidáme 460 µl izopropanolu, promícháme převrácením mikrozkuhavky.
 14. Centrifugujeme 10 min. na stolní centrifuze při 11000 x g a 4 °C (Centrifuge 5415R, Eppendorf). Pipetou odstraníme veškerou tekutinu.
 15. Přidáme 1,2 ml ledového 75% etanolu (v/v), centrifugujeme 10 min. na stolní centrifuze při 11000 x g a 4 °C (Centrifuge 5415R, Eppendorf). Pipetou odstraníme veškerou tekutinu.
 16. Precipitát rozpustíme ve 150 µl TE pufru, přidáme 150 µl 5M octanu amonného. Důkladně promícháme (vortex).
 17. Centrifugujeme 10 min. na stolní centrifuze při 11000 x g a 4 °C (Centrifuge 5415R, Eppendorf).
 18. Supernatant přendáme do nové mikrozkuhavky obsahující 660 µl etanolu. Důkladně promícháme (vortex).
 19. Centrifugujeme 10 min. na stolní centrifuze při 11000 x g a 4 °C (Centrifuge 5415R, Eppendorf). Pipetou odstraníme veškerou tekutinu.
 20. Přidáme 1 ml ledového 75% etanolu (v/v). Centrifugujeme 10 min. na stolní centrifuze při 11000 x g a 4 °C (Centrifuge 5415R, Eppendorf).
 21. Supernatant vylijeme, mikrozkuhavku necháme vysušit na čistém absorpčním papíru asi po dobu 10–15 min.
 22. DNA rozpustíme v 50 µl TE pufru.
 23. Plasmidovou DNA skladujeme při 4 °C.

Izolace plasmidové DNA z *E. coli*: JETQUICK Plasmid Miniprep Spin Kit,

GENOMED:

1. 7 ml LB média s přídatkem příslušného antibiotika zaočkujeme jednou kolonií *E. coli* a inkubujeme přes noc na třepačce při 37 °C, 220 rpm.
2. Narostlé buňky centrifugujeme 5 min. při 8000 rpm a pokojové teplotě (MR 23i, rotor AM 38.15, Jouan). Odstraníme kompletně supernatant.
3. Přidáme 250 µl roztoku G1, důkladně promícháme pipetou (dokud není suspenze homogenní) a přeneseme do 1,5ml mikrozkuhavky.

4. Přidáme 250 µl roztoku G2, opatrně promícháme převrácením mikrozkušavky. Inkubujeme 5 min. při pokojové teplotě.
5. Přidáme 350 µl roztoku G3, opatrně promícháme převrácením mikrozkušavky (dokud nezískáme homogenní suspenzi).
6. Centrifugujeme 10 min. na stolní minicentrifuze (Microspin 24S, Sorvall) při maximální rychlosti (13000–16000 x g) a pokojové teplotě.
7. Supernatant přeneseme do kolonky (JETQUICK Spin Column) umístěné ve sběrné 2ml zkumavce. Centrifugujeme 1 min. na stolní minicentrifuze při maximální rychlosti a pokojové teplotě.
8. Vyprázdníme sběrnou zkumavku. Pokud pracujeme s *endA*+ kmenem *E. coli* přidáme do kolonky 500 µl roztoku GX, necháme 1 min. stát a 1 min. centrifugujeme na stolní minicentrifuze při maximální rychlosti a pokojové teplotě, opět vyprázdníme sběrnou zkumavku.
Pokud pracujeme s *endA*- kmenem *E. coli* pokračujeme rovnou krokem 9.
9. Do kolonky přidáme 500 µl roztoku G4, centrifugujeme 1 min. na stolní minicentrifuze při maximální rychlosti a pokojové teplotě. Sběrnou zkumavku vyprázdníme a centrifugujeme ještě jednou stejným způsobem.
10. Kolonku umístíme do nové sterilní 1,5ml mikrozkušavky. Do kolonky přidáme 75 µl TE pufru a centrifugujeme 2 min. na stolní minicentrifuze při maximální rychlosti a pokojové teplotě.
11. Získanou plasmidovou DNA skladujeme při 4 °C.

Izolace plasmidové DNA z *E. coli* „boiling“ lyzí: (Sambrook & Russell 2001)

1. 1,5 ml LB média s přísadkou příslušného antibiotika ve 2ml mikrozkušavce zaočkujeme jednou kolónií *E. coli* a inkubujeme přes noc na třepačce při 37 °C, 220 rpm.
2. Centrifugujeme 30 s na stolní minicentrifuze (Microspin 24S, Sorvall) při maximální rychlosti (13000–16000 x g) a pokojové teplotě.
3. Vylijeme supernatant a buňky důkladně resuspendujeme ve zbytku tekutiny.
4. Přidáme 300 µl kompletního STET pufru. Opatrně promícháme převrácením mikrozkušavky.
5. Inkubujeme 10 min. v ledu.
6. Inkubujeme 2 min. při 100 °C.
7. Centrifugujeme 25 min. na stolní centrifuze při maximální rychlosti a 4 °C (Centrifuge 5415R, Eppendorf).
8. Odebereme horních 200 µl a přendáme do nové mikrozkušavky obsahující 200 µl izopropanolu pokojové teploty. Promícháme převrácením mikrozkušavky.
9. Inkubujeme 30 min. při -20 °C.
10. Centrifugujeme 10 min. na stolní centrifuze při maximální rychlosti a 4 °C (Centrifuge 5415R, Eppendorf).
11. Přidáme 300 µl ledového 75% etanolu (v/v). Centrifugujeme 10 min. na stolní centrifuze při maximální rychlosti a 4 °C (Centrifuge 5415R, Eppendorf), poté vylijeme supernatant. Toto promytí ještě jednou zopakujeme.
12. Mikrozkušavku necháme vysušit na čistém absorpčním papíru asi po dobu 10–15 min.
13. Přidáme 50 µl TE pufru a 1 µl zásobního roztoku RNázy A.
14. Plasmidovou DNA skladujeme při 4 °C.

3.2.2 Metody další práce s DNA

Fenol/chloroformová extrakce DNA: (Sambrook & Russell 2001)

1. K roztoku DNA přidáme 1/2 objemu neutrálního fenol/chloroformu, důkladně mícháme alespoň 10 s (vortex).
2. Centrifugujeme 10 min. na stolní centrifuze při maximální rychlosti (13000–16000 x g) a 4 °C (Eppendorf, Centrifuge 5415R).
3. Odebereme horní vodnou fázi a přeneseme do nové mikrozkuhavky.
4. DNA přesrážíme pomocí metody srážení etanolem.

Srážení DNA etanolem: (Sambrook & Russell 2001)

1. K roztoku DNA přidáme 1/10 objemu 3M octanu sodného (pH 7,0) a trojnásobný objem 100% ledového etanolu (-20 °C).
2. Srážíme minimálně 1 hodinu při -80 °C (popř. přes noc při -20 °C).
3. Centrifugujeme 15 min. na stolní centrifuze při maximální rychlosti (13000–16000 x g) a 4 °C (Centrifuge 5415R, Eppendorf).
4. Supernatant vylijeme. Přidáme 300 µl 75% ledového etanolu (v/v) a opět centrifugujeme stejným způsobem.
5. Supernatant vylijeme a necháme vysušit na čistém absorpčním papíru asi po dobu 10–15 min.
6. DNA resuspendujeme v potřebném množství sterilní dH₂O nebo TE pufru.

Měření koncentrace DNA:

Koncentrace DNA byla určena pomocí A_{260} (absorbance při vlnové délce 260 nm, což je hodnota absorpčního maxima), která byla měřena na spektrofotometru Ultrospec IIE spectrophotometer, LKB Biochrom v přiložených kyvetách typu Q (Ultrospec Cells, Q, LKB Biochrom). Jako BLANK byla použita dH₂O nebo TE pufr (podle toho, v čem byla uchovávána vzorková DNA). Hodnota $A_{260} = 1$ odpovídá 50 µg/ml dsDNA v roztoku.

Vzhledem k tomu, že izolovaná DNA je nejčastěji znečištěna proteiny (které mají absorpční maximum při vlnové délce 280nm), můžeme poměrem naměřené A_{260}/A_{280} vyjádřit také čistotu vzorku DNA. V případě čistých vzorků by se tento poměr měl pohybovat přibližně v rozmezí 1,8–2,0.

1. Vzorek DNA naředíme 50x sterilní dH₂O
2. Na spektrofotometru změříme A_{260} naředěného vzorku.
3. Koncentračním výpočtem vypočítáme koncentraci DNA ve vzorku.

Koncentrační výpočet:

koncentrace DNA = $A_{260} \cdot 0,05 \cdot$ použité ředění (50)

Štěpení DNA restrikčními endonukleázami:

Ke štěpení DNA byly použity restrikčních endonukleázy a systémy pufrů dodávané firmou Thermo Scientific.

Štěpení bylo prováděno v celkových objemech 10–30 µl po dobu 1,5–2 hodiny v pufru a teplotě doporučené výrobcem. Standardně bylo použito 0,5 µl restrikční endonukleázy na 10 µl celkového objemu a 1 µl restrikční endonukleázy při celkovém objemu větším než 10 µl. Pro štěpení bylo použito standardně 0,1–3 µg DNA (pro přípravu neradioaktivně značené DNA próby více). Do celkového objemu byla směs vždy doplněna sterilní dH₂O.

Pro štěpení dvěma restrikčními endonukleázami současně byl pro zvolení vhodného pufru použit program DoubleDigest™, Thermo Scientific (<http://www.thermoscientificbio.com/webtools/doubledigest>).

Zatupení konců molekul DNA: (Sambrook & Russell 2001)

1. Ke 30 μ l restrikční směsi po dokončení restrikčního štěpení přidáme 0,75 μ l 2mM dNTP a 1 μ l Klenow fragmentu (Thermo Scientific).
2. Inkubujeme 30 min. při 37 °C.
3. Inaktivujeme přidáním 1 μ l 0,5M EDTA (pH 8,0) a inkubací 10 min. při 70 °C.
4. DNA přečistíme pomocí fenol/chloroformové extrakce a srážení etanolem a můžeme použít pro další práci.

Ligace DNA: (Sambrook & Russell 2001)

1. DNA k ligaci po fenol/chloroformové extrakci a přesrážení etanolem rozpustíme v 35 μ l (ligace DNA fragmentu do vektoru) nebo v 90 μ l sterilní dH₂O (ligace konců vektoru).
2. Přidáme 4 μ l (na 35 μ l) nebo 10 μ l (na 90 μ l) 10x koncentrovaného T4 DNA ligačního pufru (Thermo Scientific) a 1 μ l T4 DNA ligázy (Thermo Scientific).
3. Inkubujeme přes noc při 14 °C.
4. Inaktivujeme inkubací 10 min. při 70 °C.
5. Inaktivovanou směs můžeme restrikčně štěpit po ligaci restrikčním enzymem, který linearizuje původní vektor, ale neštěpí rekombinantní plasmid. Popř. pokračujeme rovnou krokem 5.
5. DNA přesrážíme etanolem. Ligovanou DNA můžeme dále použít k transformaci.

DNA elektroforéza: (Sambrook & Russell 2001)

Byla použita elektroforéza v agarózovém gelu v horizontálním uspořádání (při konstantním napětí do 5 V/cm). Pro snadnější nanášení vzorků a sledování průběhu elektroforézy byl použit nanášecí pufr pro agarózovou elektroforézu ve výsledné koncentraci 1x.

použitý agarózový gel: 1% agaróza SeaKem® LE Agarose, Lonza (w/v) v 1x TAE pufru

použitý elektroforetický pufr: 1x TAE (naředěný ze zásobního 50x koncentrovaného TAE zásobního roztoku)

použitý velikostní standard: GeneRuler™ 1kb DNA Ladder, Ready-to-Use 250 to 10000 bp, Thermo Scientific

Gely po proběhnutí elektroforézy barvíme min. 20 min. ve vodném roztoku etidium bromidu o výsledné koncentraci 1 μ g/ml. Nenavázaný etidium bromid odmyváme pod tekoucí vodou min. 1 min. Poté DNA zviditelníme nasvícením pod ultrafialovým světlem na transiluminátoru a vyfotíme.

Izolace DNA z agarózového gelu: (Vogelstein & Gillespie 1979)

1. Vyřízneme proužky gelu, které obsahují fragment určený k izolaci (tato část gelu nesmí být obarvena etidium bromidem).
2. Vyříznutý proužek gelu zvážíme a přeneseme do 1,5ml mikrozkuhavky. Přidáme 2–3 ml roztoku NaI na 1 g gelu.
3. Inkubujeme s občasným promícháním při 53 °C do rozpuštění gelu (maximálně 5 min.).

4. Přidáme 1 μl skelného mléka (glass milk) na 1 μg DNA (minimálně však 5 μl). Dokonale promícháme (vortex).
5. Inkubujeme 5 min. na ledu, občas promícháme.
6. Centrifugujeme 15 s na stolní minicentrifuze (Microspin 24S, Sorvall) při maximální rychlosti (13000–16000 x g) a pokojové teplotě.
7. Vylijeme supernatant. Přidáme 300 μl NEW WASH promývacího roztoku a dokonale resuspendujeme (vortex). Centrifugujeme 15 s na stolní minicentrifuze při maximální rychlosti a pokojové teplotě a odstraníme supernatant. Toto promytí zopakujeme celkem třikrát.
8. Promytý sediment resuspendujeme v 50 μl sterilní dH_2O nebo TE pufru.
9. Inkubujeme 5 min. při 53 °C.
10. Centrifugujeme 1 min. na stolní minicentrifuze při maximální rychlosti a pokojové teplotě.
11. Odebereme supernatant do nové mikrozkušavky. Pro další práci je vhodné DNA přechistit pomocí fenol/chloroformové extrakce a srážení etanolem.

PCR reakce: GC-RICH PCR System, Roche: (Mullis *et al.* 1986)

Pro PCR reakce, v níž byla jako templát použita chromozomální DNA ze streptomycet, byla použita komerční sada GC-RICH PCR System, Roche. Jedná se o speciálně navrženou sadu pro provádění PCR reakcí u DNA templátů, které mají vysoký podíl GC párů (viz. kapitola 2.1.1). Všechny operace provádíme na ledu, v rukavicích a používáme jen čisté a sterilní špičky a mikrozkušavky. K výpočtu teploty nasedání oligonukleotidů (tzv. „primerů“) byla použita teplota tání (T_m) uvedená výrobcem.

Smísíme následující složky:

„mastermix 1“:

1 μg templátová DNA (výpočet podle koncentrace chromozomální DNA)
 5 μl 2mM dNTP
 0,2 μl „primer FORWARD“
 0,2 μl „primer REVERSE“
 10 μl GC-RICH Resolution Solution, 5M
 doplníme sterilní dH_2O do celkového objemu 35 μl

„mastermix 2“:

4 μl sterilní dH_2O
 10 μl GC-RICH Reaction Buffer, 5x
 1 μl GC-RICH Enzyme Mix, in storage buffer

Do sterilní PCR mikrozkušavky přeneseme 35 μl připraveného roztoku „mastermix 1“ a 15 μl roztoku „mastermix 2“. PCR mikrozkušavku umístíme do termocykleru (T-Gradient Thermocycler, Whatman Biometra) naprogramovaného na následující cykly:

1. denaturace	3 min.	95 °C
2. celkem 10 cyklů		
denaturace	30 s	95 °C
nasedání oligonukleotidů	30 s	dle oligonukleotidů (výpočet = $T_m - 4$ °C)
elongace	45 s/1 kb	72 °C

3. celkem 20 cyklů

denaturace	30 s	95 °C
nasedání oligonukleotidů	30 s	dle oligonukleotidů (výpočet = $T_m - 4$ °C)
elongace	45 s/1 kb + 5 s v každém dalším cyklu	72 °C

4. dosyntetizování řetězců 7 min. 72 °C

Po proběhnutí všech cyklů byla teplota snížena na 4 °C.

Sekvenování DNA:

Sekvence PCR produktů byla prováděna externě ve Středisku sekvenování DNA, MBÚ AV ČR, v.v.i.. Toto pracoviště využívá automatický genetický analyzátor 3130xl, Applied Biosystems.

použité oligonukleotidy pro sekvenační reakce:

LCFACAL-F a A31-F1 (viz. kapitola 3.1.6)

příprava vzorku:

PCR produkt určený k sekvenaci byl izolován z gelu, dvakrát přečištěn pomocí fenol/chloroformové extrakce a zakoncentrován do celkového objemu 12 μ l (rozpuštěno ve sterilní dH₂O) pomocí srážení etanolem.

Příprava neradioaktivně značené DNA próby: DIG DNA Labeling Kit, Roche:

DNA próba pro hybridizaci byla označena neradioaktivně digoxigeninem pomocí náhodných hexanukleotidových primerů, dNTP značící směsi (obsahující Dig-dUTP) a Klenow enzymu.

1. Přesrážený a vysušený DNA fragment pro přípravu próby rozpustíme v 15 μ l sterilní dH₂O.
2. Denaturujeme 10 min. při teplotě 100 °C. Poté ihned prudce zchladíme v ledu politém etanolem.
3. Ke směsi na ledu ihned přidáme 2 μ l hexanukleotidové směsi, 2 μ l dNTP značící směsi a 1 μ l Klenow enzymu.
4. Inkubujeme přes noc při 37 °C.
5. Reakci zastavíme přidáním 1 μ l 0,5M EDTA (pH 8,0) a inkubací 10 min. při 65 °C.
6. Přidáme 2,5 μ l 4M LiCl a 75 μ l ledového (-20 °C) etanolu. Promícháme (vortex) a necháme srážet minimálně 30 min. při -80 °C (popř. min. 2 hodiny při -20 °C).
7. Centrifugujeme 15 min. na stolní centrifuze při maximální rychlosti (13000–16000 x g) a 4 °C (Centrifuge 5415R, Eppendorf).
8. Supernatant vylijeme. Přidáme 300 μ l 75% ledového (-20 °C) etanolu (v/v). Centrifugujeme 15 min. na stolní centrifuze při maximální rychlosti a 4 °C (Centrifuge 5415R, Eppendorf).
9. Supernatant vylijeme a necháme vysušit na čistém absorpčním papíru asi po dobu 10–15 min.
10. DNA rozpustíme v 50 μ l sterilní dH₂O.
11. DNA próbu denaturujeme 10 min. při 100 °C a ihned použijeme k hybridizaci.

Přenos DNA fragmentů z agarózového gelu na nylonovou membránu („Southern blotting“): (Sambrook & Russell 2001)

Pro přenos DNA fragmentů z agarózového gelu na nylonovou membránu bylo využito metody podtlaku za pomoci systému XL Vacuum Blotting System, VacuGene. Byla použita nylonová membrána IMOBILON – NY+, Millipore. Pracujeme v rukavicích.

1. Připravíme si nylonovou membránu příslušné velikosti (asi o 0,3 cm větší než gel na výšku i na šířku). Membránu namočíme krátce do 20x SSC.
2. Sestavíme vakuový přístroj dle instrukčního manuálu na vodorovné ploše, na jeho desku položíme připravenou membránu a přes ni igelitovou masku s připraveným otvorem na membránu (otvor musí být o něco menší než připravená membrána i gel). Do otvoru masky na membránu položíme gel tak, aby jamky i okraje gelu ležely na masce.
3. Na vakuové pumpě nastavíme tlak 50 cm H₂O sloupce. Zkontrolujeme, zda se skutečně vytvořil správný podtlak.
4. Celý gel přečtvíme depurinačním roztokem, přesáváme 10–15 min. Roztok průběžně doplňujeme.
5. Depurinační roztok kompletně odsajeme a nahradíme ho denaturačním roztokem, přesáváme 10–15 min. Roztok průběžně doplňujeme.
6. Denaturační roztok kompletně odsajeme a nahradíme ho neutralizačním roztokem, přesáváme 10–15 min. Roztok průběžně doplňujeme.
7. Neutralizační roztok kompletně odsajeme a nahradíme ho transferovým roztokem (20x SSC), přesáváme 30–60 min. Roztok průběžně doplňujeme.
8. Transferový roztok odsajeme, odstraníme gel a vypneme vakuový přístroj. Membránu vysušíme mezi dvěma čistými filtračními papíry.
9. Membránu ozáříme 5 min. ultrafialovým světlem (fixace DNA k membráně) na transiluminátoru a použijeme ihned k hybridizaci nebo můžeme uchovávat několik dní na suchém místě mezi dvěma čistými filtračními papíry.

Hybridizace fragmentů DNA na nylonové membráně s neradioaktivně značenou DNA **próbu a následná imunologická detekce:**

Po hybridizaci značené próby s cílovou DNA byly hybridní molekuly nesoucí DIG značku detekovány vazbou anti-DIG protilátky konjugované s alkalickou fosfatázou (AP-konjugát). Alkalická fosfatáza byla následně zviditelněna reakcí s X-fosfátem a NBT-roztoku, jejímž výsledkem je barevný produkt. Pro označení velikostního DNA standardu byla použita neradioaktivně značená próba „Gene Ruler“ (viz. kapitola 3.1.3).

A. Prehybridizace:

1. Membránu vložíme do hybridizační trubice a přidáme 20 ml hybridizačního roztoku na 100 cm² membrány (všechny další objemy budou vztaženy právě na velikost 100 cm²).
2. Inkubujeme v hybridizační pídce (HPOI & HPIO MiniOven, Apollo) za pomalého otáčení při 68 °C minimálně 1 hodinu.

B. Hybridizace:

1. Hybridizační roztok slíjeme, přidáme 2,5 ml nového hybridizačního roztoku a předehejeme na 68 °C.
2. Do předeřátého roztoku přidáme zdenaturovanou DNA próbu.
3. Necháme hybridizovat v hybridizační pídce za pomalého otáčení při 68 °C přes noc.
4. Membrány promyjeme 2 x 5 min. za pokojové teploty min. 50 ml promývacího roztoku 1 a 2 x 15 min. při 68 °C minimálně 50 ml předeřátého (68 °C) promývacího roztoku 2.

C. Imunologická detekce:

1. Membránu krátce (asi 1 min.) promyjeme pufr 1.
2. K membráně přidáme 100 ml pufru 2 a inkubujeme 30 min. na třepačce (Multifunction 3D rotator PS-M3D, Grant-Bio).
3. Slijeme pufr 2 a krátce promyjeme pufr 1.
4. Přidáme naředěnou konjugovanou protilátku (AP-konjugát) do koncentrace 150 mU/ml v pufru 1 (na 100 cm² membrány byly použity 4 µl protilátky ve 20 ml pufru 1).
5. Inkubujeme 30 min. na třepačce. Slijeme roztok s protilátkou.
6. Odstraníme nenavázanou protilátku promýváním 2 x 15 min. v min. 100 ml pufru 1 na třepačce.
7. Membránu 2 min. ekvilibrujeme ve 20 ml pufru 3 na třepačce.
8. Odstraníme pufr 3 a na membránu nanese 10 ml barvicího roztoku. Inkubujeme bez třepání ve tmě 30 minut – 24 hodin.
9. Po detekci zastavíme reakci pětiminutovou inkubací membrány v TE pufru.
10. Membránu vysušíme mezi dvěma čistými filtračními papíry a oskenujeme.
11. Membrány skladujeme v suchu a temnu.

3.2.3 Metody transformace buněk plasmidovou DNA

Příprava kompetentních buněk *E. coli*: (Sambrook & Russell 2001)

OD₆₀₀ (optická denzita při 600 nm) byla měřena na spektrofotometru Ultrospec IIE spectrophotometer, LKB Biochrom v přiložených kyvetách typu G (Ultrospec Cells, G, LKB Biochrom). Jako BLANK bylo použito sterilní LB médium. První vzorek z kultivace byl odebrán po 2 hodinách a následně v době předpokládaného dosažení požadované OD₆₀₀ (za předpokladu, že se OD₆₀₀ za 30 min. zhruba zdvojnásobí).

1. 5 ml LB média (popř. s přidavkem příslušného antibiotika) zaočkujeme jednou kolonií *E. coli* a inkubujeme přes noc na třepačce při 37 °C, 220 rpm.
2. Z narostlé kultury zaočkujeme 2 ml do 200 ml LB média v litrové baňce.
3. Inkubujeme na třepačce při 37 °C, 220 rpm do dosažení OD₆₀₀ = 0,7 (v případě *E. coli* XL1-Blue postačí hodnota OD₆₀₀ = 0,5).
4. Buňky ochladíme v ledu a přelijeme do sterilních, vychlazených centrifugačních zkumavek.
5. Centrifugujeme 8 min. při 8000 rpm a 4 °C (MR 23i, rotor AM 100.13, Jouan).
6. Slijeme supernatant a buňky resuspendujeme ve 200 ml ledové sterilní dH₂O. Centrifugujeme 8 min. při 8000 rpm a 4 °C (MR 23i, rotor AM 100.13, Jouan), slijeme supernatant. Toto promytí ještě jednou zopakujeme.
7. Buňky resuspendujeme v 300–500 µl 10% sterilního ledového glycerolu (v/v).
8. Resuspendované buňky rozdělíme po 50 µl do sterilních 1,5ml mikrozkušavek a použijeme ihned k transformaci nebo uchovááme při -80 °C.

Transformace kompetentních buněk *E. coli* pomocí elektroporace:

(Sambrook & Russell 2001)

1. Ve sterilní 1,5ml mikrozkušavce smícháme 1 µl plasmidové DNA (koncentrace DNA 0,5–1 µg/ml) a 50 µl kompetentních buněk *E. coli*.
2. Inkubujeme 10 min. na ledu.
3. Směs DNA/buňky přeneseme do sterilní elektroporační kyvety (GenePulser[®] Cuvette, 0,1 cm gap, BioRad), kterou jsme předtím vychladili v ledu. Směs DNA/buňky je nutno přenést do elektroporační kyvety přímo na dno tak, aby nevznikly žádné bublinky.

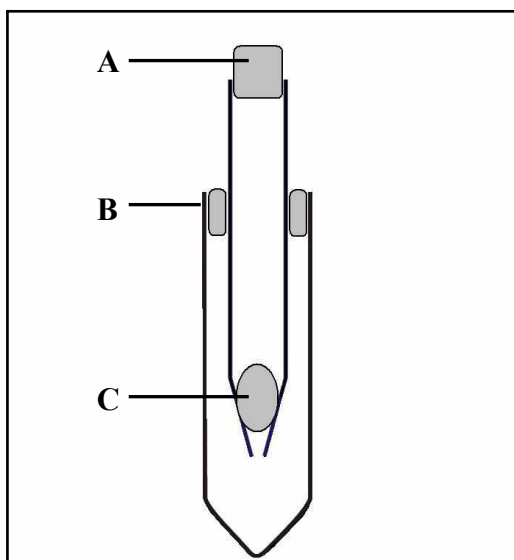
4. Kyvetu z vnější strany osušíme a vložíme do elektroporátoru (Electro Square Porator ECM 830, BTX Division of Genetronics). Nastavení elektroporátoru: Program – HV, Napětí 2000 V, Délka pulzu – 99 μ s, Množství pulzů – 10, Interval mezi pulzy – 100 ms. Provedeme elektroporaci.
5. Ihned po elektroporaci přidáme ke směsi DNA/buňky 1 ml sterilního SOC média a přeneseme do sterilní mikroskopické zkumavky.
6. Inkubujeme 1–2 hodiny na třepačce při 37 °C, 1200 rpm (Thermomixer Comfort, Eppendorf).
7. Buňky vysejeme na připravené misky s LA médiem s přídatkem příslušného antibiotika.
8. Inkubujeme přes noc ve 37 °C.

Příprava protoplastů ze *Streptomyces nodosus*: (Kieser *et al.* 2000)

1. 80 ml YEME média s glycinem v 500ml prolamované Erlenmayerově baňce zaočkujeme sporamai a inkubujeme na třepačce 52 hodin při 28 °C, 220 rpm (správně narostlé kultury poznáme podle začínající produkce pigmentu).
2. 20 ml z narostlé kultury přelijeme do sterilní centrifugační zkumavky a centrifugujeme 10 min. při 8000 rpm a 20 °C (MR 23i, rotor AM 50C.13, Jouan). Slijeme supernatant.
3. Buňky resuspendujeme v 15 ml sterilní 10,3% sacharózy (w/v) a opět centrifugujeme stejným způsobem. Slijeme supernatant.
4. Buňky resuspendujeme ve 4 ml kompletního L pufru s lysozymem.
5. Inkubujeme 30–60 min. při 30 °C. Každých 15 min. opatrně promícháme pomalým převrácením zkumavky. Utváření protoplastů kontrolujeme pod mikroskopem (měly by být přítomny pouze protoplasty, použité zvětšení: 1000x s imerzním systémem).
6. Přidáme 5 ml P pufru a opatrně krouživými pohyby promícháme.
7. Protoplasty přefiltrujeme přes vatou umístěnou ve filtrační zkumavce (Obr. 15)
8. Zfiltrované protoplasty centrifugujeme 7 min. při 700 x g a 20 °C (MR 23i, rotor AM 50C.13, Jouan)
9. Slijeme supernatant a protoplasty doplníme do celkového objemu 1 ml P pufrém.
10. Protoplasty v P pufru rozdělíme do sterilních 1,5ml mikroskopických zkumavek po 50 μ l a použijeme ihned k transformaci nebo uchovááme při -80 °C.

Transformace protoplastů: (Kieser *et al.* 2000)

1. Do sterilní 1,5ml mikroskopické zkumavky přeneseme 5 μ l plasmidové DNA (pokud je plasmidová DNA izolována z *E. coli*, používáme výhradně kmen GM2929) . Na stěnu mikroskopické zkumavky přeneseme 50 μ l protoplastů tak, aby nedošlo ke smísení s plasmidovou DNA (pro pipetování protoplastů používáme vždy sterilní špičky s ustřiženým koncem).
2. Přidáme 200 μ l T pufru tak, aby došlo k promísení s plasmidovou DNA i protoplasty, několikrát pipetou promícháme.
3. Směs ihned rozetřeme na Petriho misku s R5 médiem, které bylo před transformací sušeno 2 hodiny ve sterilním boxu.
4. Inkubujeme při 28 °C 18 hodin (i déle). Poté přelijeme směs 1 ml sterilní dH₂O s příslušným antibiotikem (množství antibiotika se řídí výslednou koncentrací v R5 médiu).
5. Inkubujeme při 28 °C 6 dní (i déle).



Obr. 15: Schéma vatové filtrace. (A) vatová zátka, (B) vatový límeček, (C) filtrační smotek vaty. Při použití odstraníme zátku a protoplasty necháme protéct přes vatu do zkumavky.

3.2.4 Metody výměny genů ve streptomycetách

Příprava mutantního kmenu *Streptomyces nodosus* ssp. *asukaensis* Δ *asuC13*–*C14* pomocí homologní rekombinace: (Kieser *et al.* 2000)

K přípravě mutantního kmenu *Streptomyces nodosus* ssp. *asukaensis* Δ *asuC13*–*C14* bylo využito homologní rekombinace pomocí plasmidu pPMQ (Obr. 16). Ten je odvozen od vektoru pGM160, který obsahuje teplotně senzitivní replikační počátek pro replikaci ve streptomycetách (viz. kapitola 3.1.2). Kmen *Streptomyces nodosus* ssp. *asukaensis* (*asuC13::apr^R*) nese na chromozómu v místě *asuC13* vložený gen pro apramycinovou rezistenci (viz. kapitola 3.2.1), jejíž vymizení je využitelné jako ukazatel proběhlé rekombinace.

1. 10 ml YEME s přidavkem příslušného antibiotika zaočkujeme sporami transformovaných buněk a inkubujeme na třepačce při 28 °C, 220 rpm 2–4 dny (dokud se neobjeví specifický zákal).
2. Narostlé buňky centrifugujeme 5 min. při 8000 rpm a pokojové teplotě (MR 23i, rotor AM 38.15, Jouan). Odstraníme kompletně supernatant.
3. K sedimentovaným buňkám přidáme dostatečné množství sterilní dH₂O (minimálně tolik, jako bylo média) a centrifugujeme 5 min. při 8000 rpm a pokojové teplotě (MR 23i, rotor AM 38.15, Jouan). Odstraníme kompletně supernatant.
4. Promyté buňky resuspendujeme v malém množství YEME a zaočkujeme jím 80 ml YEME v 500ml prolamované Erlenmayerově baňce.
5. Inkubujeme na třepačce při 39 °C, 200 rpm 3 dny.
6. Z kultury odebereme sterilně 10 μ l a vysejeme je v ředění 10⁻² a 10⁻³ na misky obsahující MH médium s apramycinem a MH médium bez přidaných antibiotik. Misky inkubujeme při 28 °C do nárůstu viditelných kolonií. V kultivaci při 39 °C dále pokračujeme a výsev opakujeme každé 2 dny.
7. Sledujeme počet narostlých kolonií na MH médiu s apramycinem a na MH médiu bez přidaných antibiotik. Pokud se na misce bez antibiotik vyskytuje více kolonií než na misce s apramycinem, přeočkujeme alespoň 70 kolonií z misky bez přidaných antibiotik na nové MH médium s apramycinem a na MH médium bez přidaných antibiotik. Inkubujeme opět při 28 °C do nárůstu viditelné biomasy.

8. Z přeočkovaných misek vybíráme kmeny, které rostou na MH médiu bez přidaných antibiotik a nerostou na MH médiu s apramycinem (ztratily apramycinovou resistenci). Rekombinantní kmen dále ověříme metodou hybridizace se značenou DNA próbou (viz. kapitola 3.2.2).

3.2.5 Separační a analytické metody

Extrakce sekundárních metabolitů ze streptomycet (etylacetát/chloroformová extrakce):

Etylacetát/chloroformovou extrakcí získáme hrubý extrakt obsahující sekundární metabolity (např. manumycinová antibiotika), ale také např. buněčné lipidy a některé další složky. Během extrakce pracujeme v chladové místnosti (4 °C). Pokud právě není s extraktem pracováno, uchováváme ho neustále ve tmě.

1. 50 ml produkčního média (s přídavkem příslušného antibiotika) zaočkujeme sporama a inkubujeme na třepačce při 28 °C, 220 rpm 2 dny.
2. Z narostlé kultury zaočkujeme 30 ml do 300 ml nového produkčního média (s přídavkem příslušného antibiotika). Inkubujeme na třepačce při 28 °C, 220 rpm 3 dny.
3. Veškeré médium přelijeme do centrifugačních zkumavek a centrifugujeme 15 min. při 4400 rpm a 20 °C (MR 23i, rotor SWM 180.5, Jouan). Supernatant slijeme do skleněné kádinky. Dále pracujeme zvlášť se supernatantem a se sedimentovanými buňkami.

Supernatant:

1. V supernatantu rozpustíme NaCl v takovém množství, aby vznikl nasycený roztok (odpovídá asi 5M koncentraci).
2. K nasycenému roztoku přidáme 1/3 objemu etylacetátu.
3. Přeneseme do dělicí nálevky a necháme třepat 30 min. na reciproční třepačce (3006, GFL) při rychlosti třepání 250–300 rpm. v chladové místnosti ve tmě.
4. V dělicí nálevce necháme oddělit fáze. Horní organickou fází centrifugujeme ve skleněných centrifugačních zkumavkách 15 min. při 4400 rpm a 4 °C (MR 23i, rotor SWM 180.5, Jouan).
5. Skleněnou pipetou odebereme horní etylacetátovou fází a přeneseme do sběrné baňky. Spodní fází vrátíme do dělicí nálevky, přidáme znovu 1/3 etylacetátu a celou extrakci opakujeme ještě jednou.

Sedimentované buňky:

1. K sedimentovaným buňkám přidáme 50 ml acetonu a rozmělníme na homogenní suspenzi.
2. Acetonovou suspenzi přeneseme do skleněné baňky a necháme třepat 30 min. na reciproční třepačce (3006, GFL) při rychlosti třepání 250–300 rpm v chladové místnosti ve tmě.
3. Centrifugujeme ve skleněných centrifugačních zkumavkách 15 min. při 4400 rpm a 4 °C (MR 23i, rotor SWM 180.5, Jouan). Supernatant přelijeme do sběrné baňky. K sedimentu přidáme 50 ml acetonu a celou extrakci opakujeme ještě jednou.
4. Veškerou acetonovou fází ze sběrné baňky přeneseme do odpařovací baňky a necháme na rotační vakuové odparce (LABOROTA 4003 – control, Heidolph Instruments) při teplotě vodní lázně 37 °C a podtlaku 250 mbar za rychlého otáčení odpařit veškerý aceton (v baňce zůstane malé množství vodné fáze).
5. K vodné fázi přidáme 1/3 objemu etylacetátu, přeneseme do dělicí nálevky a provedeme stejnou etylacetátovou extrakci, jako v případě supernatantu. Veškeré etylacetátové fáze přenášíme do jedné sběrné baňky.

Získané etylacetátové fáze:

1. Veškerou etylacetátovou fází přeneseme do odpařovací baňky a necháme zcela odpařit na rotační vakuové odparce (LABOROTA 4003 – control, Heidolph Instruments) při teplotě vodní lázně 37 °C a podtlaku 150 mbar za rychlého otáčení.
2. K odparku přidáme asi 30 ml chloroformu a převedeme do nové, předem zvážené odpařovací baňky.
3. Necháme zcela odpařit na rotační vakuové odparce (LABOROTA 4003 – control, Heidolph Instruments) při teplotě vodní lázně 37 °C a podtlaku 150 mbar za rychlého otáčení.
4. Baňku s odparkem zvážíme, odečtením hmotnosti baňky získáme přesnou hmotnost odparku (suchého extraktu).
5. K odparku přidáme 1–2 ml chloroformu a přeneseme do vialky z tmavého skla. Extrakt skladujeme při -20 °C.

Chromatografie na tenké vrstvě (TLC):

Metoda TLC (Thin Layer Chromatography) byla použita pro potvrzení přítomnosti manumycinových látek v etylacetát/chloroformových extraktech. Použité tenké vrstvy obsahují fluorescenční látku označenou jako F₂₅₄. Ta zajišťuje fluorescenci tenké vrstvy při ozáření ultrafialovým světlem (vlnová délka 254 nm). Látky absorbující ultrafialové světlo jsou zviditelněny jako temné skvrny (v těchto místech nemůže docházet k fluorescenci).

použitá stacionární fáze: TLC aluminium sheets 20 x 20 cm Silica gel 60 F₂₅₄, Merck

použitá mobilní fáze: benzen–aceton v poměru 3 : 2

1. Připravíme si tenkou vrstvu příslušné velikosti (dle počtu nanášených vzorků).
2. Tužkou si lehce naznačíme startovní linku (1,5 cm od spodního okraje) a na tuto linku označíme místa pro nanášení vzorků (vzdálenost vzorků musí být min. 1 cm).
3. Pomocí mikrostříkačky nanese na vyznačená místa 10 µl (v případě málo koncentrovaných vzorků i více) vzorku (extraktu). Vzorky nanášíme postupně, v co nejmenších kapkách, vždy po zaschnutí předchozí kapky, abychom je nanесли na co nejmenší plochu (průměr nanesené kapky by měl být max. 2 mm).
4. Tenkou vrstvu umístíme do vyvíjecí kolony, do které jsme nalili dostatečné množství mobilní fáze (množství mobilní fáze musí být takové, aby byla startovní čára s nanesenými vzorky nad hladinou). Necháme vyvíjet, dokud mobilní fáze nedoputuje na konec tenké vrstvy.
5. Tenkou vrstvu vyjmeme z vyvíjecí kolony a necháme uschnout.
6. Tenkou vrstvu použijeme pro biologický test přítomnosti antimikrobiálních látek nebo ji ozáříme ultrafialovým světlem a vyfotografujeme.

Biologický test přítomnosti antimikrobiálních látek:

Biologickým testem zjistíme přítomnost antimikrobiálních látek, ke kterým je citlivý použitý mikroorganismus (*Bacillus subtilis*). Výsledkem je vznik inhibičních zón v místech, kde z tenké vrstvy difundují do média antimikrobiální látky. Byl použit systém dvou vrstev agarů, které poskytují lepší zaostření inhibičních zón při následném odečítání.

1. Do čtvercové misky na vodorovné podložce nalijeme 100 ml nutrient agaru a necháme ztuhnout.
2. Na ztuhlou vrstvu nalijeme směs 100 ml horkého nutrient agaru a 2 ml suspenze endospór *Bacillus subtilis*. Necháme ztuhnout.

3. Na takto připravenou miskou s médiem přiložíme tenkou vrstvu, která nebyla vystavena ultrafialovému záření. Tenkou vrstvu vyhladíme tak, aby se na spodní straně netvořily žádné bubliny.
4. Necháme 10 min. difundovat látky z tenké vrstvy do agaru.
5. Odstraníme tenkou vrstvu, přiklopíme víčkem a inkubujeme přes noc při 37 °C.
6. Druhý den odečítáme přítomnost inhibičních zón.

Analýza extraktů pomocí ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie s detekcí diodového pole a hmotnostní detekcí (UHPLC-DAD-ToFMS) :

UHPLC analýzy (Ultra High-Performance Liquid Chromatography) byly prováděny na systému Acquity UPLC, Waters. Systém sestává z Acquity UPLC vysokotlakého čerpadla, Acquity UPLC dávkovače vzorků, Acquity UPLC kolonového termostatu, Acquity UPLC DAD detektoru diodového pole (DAD) a hmotnostního detektoru LCT Premier XE, Waters s elektrosprejem (ESI) a ortogonálně uspořádaným analyzátozem doby letu (ToF, Waters MS). Data byla zpracována za použití programu MassLynx, verze 4.1, Waters (http://www.waters.com/waters/en_US/MassLynx-MS-software/nav.htm?locale=en_US&cid=513662).

Hmotnostní spektrometrie pracuje s dělením podle poměru hmotnosti a náboje dané látky (m/z). Obecně se ToFMS analyzátor vyznačuje vysokou přesností hmoty, vysokým rozlišením a vysokou citlivostí. Program na zpracování dat MassLynx nabízí aplikace vhodné pro určení elementárního složení analyzované látky, tzv. „Elemental composition editor“. Tento editor používá CHNO algoritmus a určuje elementární složení látky na principu přesnosti hmoty (odchylky naměřené od teoretické m/z v jednotkách ppm; Δ ppm) a přesného numerického srovnání teoretického a naměřeného izotopického profilu dané sloučeniny (tzv. „i-FIT“).

příprava vzorků:

- chloroformový extrakt (20 μ l) byl naředěn metanolem v poměru 1 : 1
- vzorky byly centrifugovány 3 min. na stolní minicentrifuze (Microspin 24S, Sorvall) při maximální rychlosti
- 20 μ l horní vrstvy bylo přeneseno do analytické vialky a nástavcem

chromatografické podmínky:

- kolona Acquity UPLC BEH C18 (100 \times 2,1 mm i.d., 1,7 μ m), Waters
- složení mobilní fáze: (A) kyselina mravenčí – voda 0,1:99,9 (v/v), (B) acetonitril
- průtoková rychlost mobilní fáze: 0,4 ml/min.
- gradientová eluce (min/%A): 0/90, 12/40, 15/20, 16/20, 18/0, 20/90
- teplota kolony: 25 °C, teplota vzorků: 10 °C; objem nástřiku: 1 μ l

MS detekce:

- ionizace elektrosprejem v negativním ionizačním módu (ESI⁻)
- napětí na vstupním kuželu: 40 V, napětí na sprejové kapiláře: -2500 V
- teplota bloku iontového zdroje: 120 °C, teplota desolvatačního plynu – dusíku: 350 °C
- průtok desolvatačního plynu: 800 l/h, průtok plynu na vstupním kuželu: 50 l/h
- W mód, čas skenu: 0,1 s, časová prodleva mezi skeny: 0,01 s
- specifické [M-H]⁻ ionty byly extrahovány s hmotnostním oknem o šířce 0,01 Da.

Teoretické hodnoty analyzovaných látek:

Asukamycin (Obr. 1):

sumární vzorec: $C_{31}H_{34}N_2O_7$

tR = 12,3 min.

m/z (monoizotopická) = 546,2366

m/z (monoizo; ES-) = 545,2288

Asukamycin s tetraenovým spodním řetězcem („asukamycin-tetraen“) (Obr. 24):

sumární vzorec: $C_{33}H_{36}N_2O_7$

tR = 13,0 min.

m/z (monoizotopická) = 572,2523

m/z (monoizo; ES-) = 571,2444

4. Výsledky

4.1. Příprava mutantního kmenu *Streptomyces nodosus* ssp. *asukaensis* Δ *asuC13-C14*

Pomocí metod klasického klonování byl sestrojen plasmid pPMQ (Obr. 16). Základem plasmidu pPMQ se stal vektor pGM160 (viz. kapitola 3.1.2). Do tohoto vektoru byla vložena část sekvence z genového shluku asukamycinu obsahující oblast genů *asuE3-C15* nesoucí v místě genů *asuC13-C14* tzv. „in-frame“ delecí (nedochází k posunu čtecího rámce ani vytvoření předčasného stop kodonu) (Obr. 16). Tato deleční genová kazeta byla následně pomocí homologní rekombinace zařazena do chromozómu mutantního kmenu *Streptomyces nodosus* ssp. *asukaensis* (*asuC13::apr^R*). Ten má na chromozómu v oblasti genu *asuC13* vložený gen pro apramycinovou rezistenci, jejíž vymizení bylo použito jako ukazatel proběhlé rekombinace (viz. kapitola 3.1.1). Na chromozómu došlo k rekombinaci homologních úseků a vznikl tak mutantní kmen *Streptomyces nodosus* ssp. *asukaensis* Δ *asuC13-C14*. Při růstu na MH médiu tento kmen nevykazoval žádnou produkci žlutých pigmentů.

4.1.1 Izolace plasmidu pMQ06 a vytvoření delece v oblasti genů *asuC13-C14*

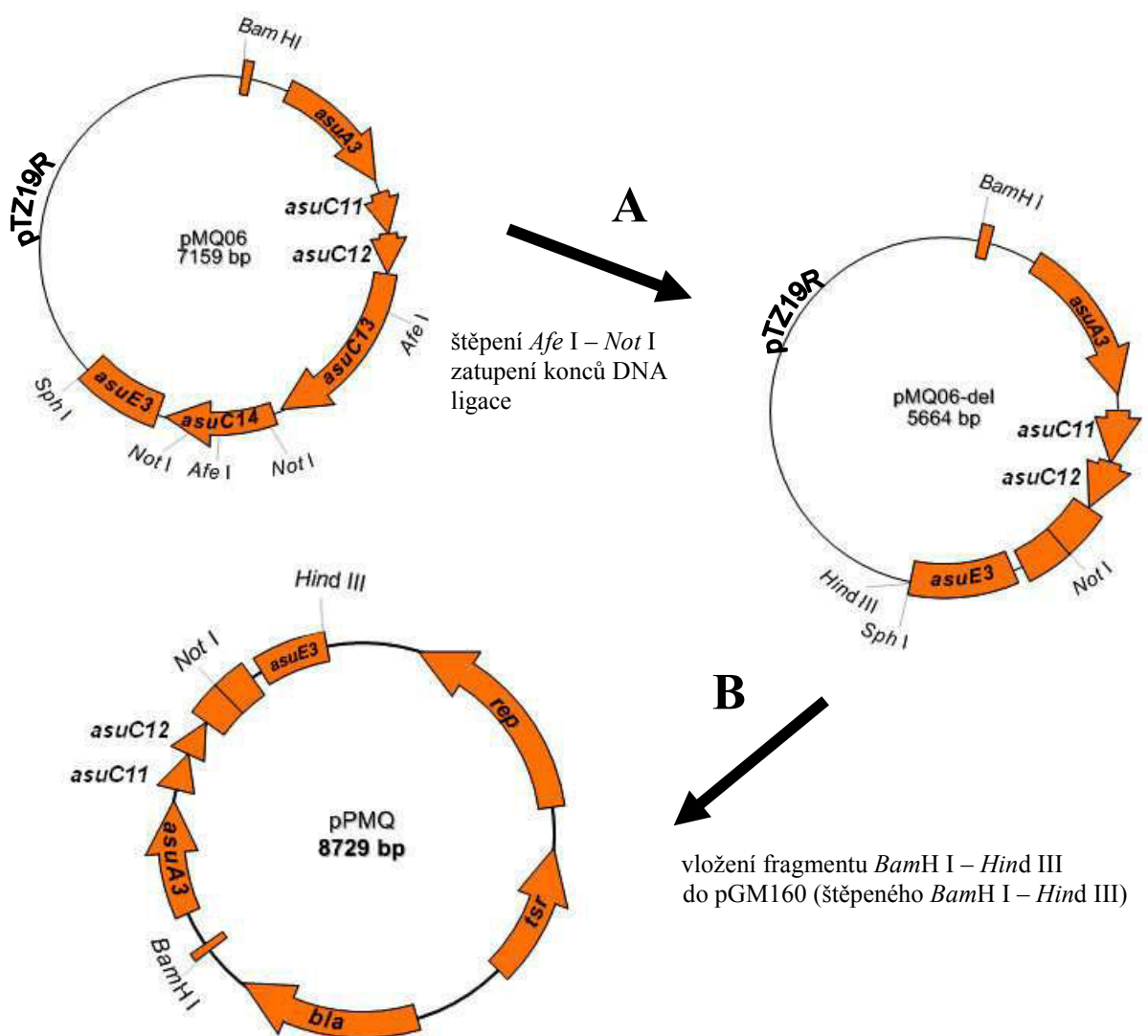
Získaným vzorkem plasmidu pMQ06 (viz. kapitola 3.1.2) byly transformovány kompetentní buňky *E. coli* XL1-Blue (viz. kapitoly 3.1.1, 3.2.3). Transformované buňky byly selektovány na LA médiu s ampicilinem. Plasmid pMQ06 byl následně izolován z transformovaných buněk pomocí komerčně dodávané sady JETQUICK (viz. kapitola 3.2.1). Kvalita a správnost izolované plasmidové DNA byla ověřena štěpením kombinací restričních endonukleáz *Hind* III – *Bam*H I a následnou gelovou elektroforézou (viz. kapitola 3.2.2). Velikost naštěpených fragmentů na gelové elektroforéze byla porovnávána s předpokládanou velikostí vypočtenou z genové mapy plasmidu, která byla obdržena společně s plasmidem. U získaného plasmidu pMQ06 byla změřena koncentrace DNA (viz. kapitola 3.2.2) a byl použit k další práci.

Plasmid pMQ06 (1 μ g DNA) byl štěpen kombinací restričních endonukleáz *Afe* I – *Not* I. Po štěpení byl zatupen přesahující konec (*Not* I) působením Klenow fragmentu (viz. kapitola 3.2.2). Takto upravená směs byla následně ligována (viz. kapitola 3.2.2) (Obr. 16). Ligační směsi byly transformovány kompetentní buňky *E. coli* XL1-Blue (viz. kapitola 3.2.3). Transformované buňky byly selektovány na LA médiu s ampicilinem. Vzniklý plasmid s „in-frame“ delecí, označený jako pMQ06-del (Obr. 16), byl izolován z transformovaných buněk pomocí „boiling“ lyze (viz. kapitola 3.2.1). Kvalita a správnost izolovaného plasmidu byla ověřena štěpením různými kombinacemi restričních endonukleáz (*Hind* III – *Bam*H I, *Hind* III – *Not* I a *Bam*H I – *Not* I) a následnou gelovou elektroforézou (viz. kapitola 3.2.2). U získaného plasmidu pMQ06-del se správnou velikostí naštěpených fragmentů byla změřena koncentrace DNA (viz. kapitola 3.2.2) a byl použit k další práci.

4.1.2 Příprava plasmidu pPMQ

Plasmid pMQ06-del (1 μ g DNA) a vektor pGM160 (1 μ g DNA) (viz. kapitola 3.1.2) byly štěpeny kombinací restričních endonukleáz *Hind* III – *Bam*H I. Tyto restriční směsi byly nanášeny na gelovou elektroforézu a z gelu byly izolovány DNA fragmenty o velikosti asi 2800 bp v případě pMQ06-del a asi 6140 bp v případě pGM160 (viz. kapitola 3.2.2). Fragmenty byly společně ligovány (viz. kapitola 3.2.2) (Obr. 16). Ligační směsi byly transformovány kompetentní buňky *E. coli* XL1-Blue (viz. kapitola 3.2.3). Transformované buňky byly selektovány na LA médiu s ampicilinem. Vzniklý plasmid, označený jako pPMQ

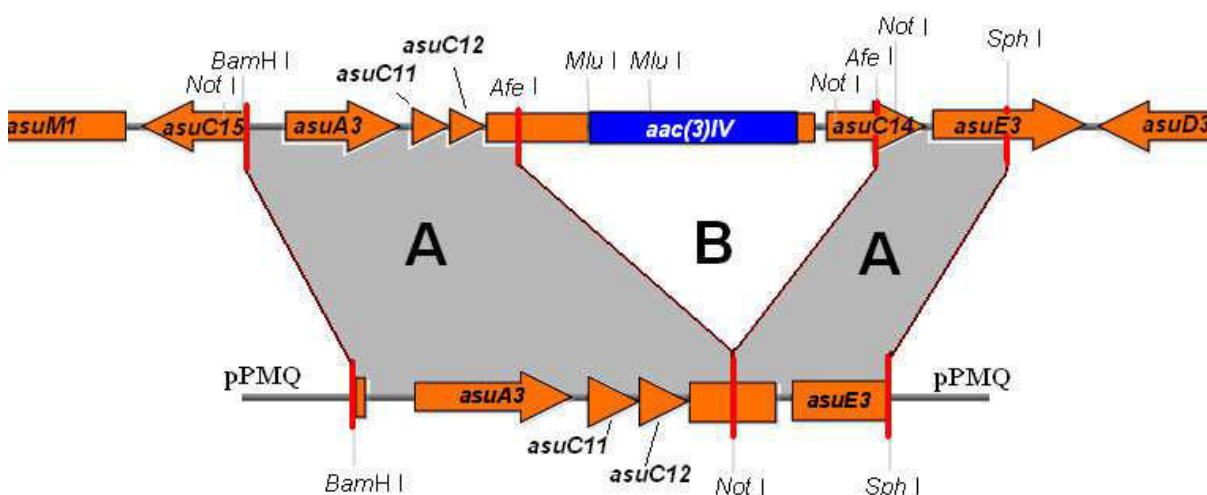
(Obr. 16) byl izolován pomocí „boiling“ lyze (viz. kapitola 3.2.1). Kvalita a správnost izolovaného plasmidu byla ověřena štěpením různými kombinacemi restričních endonukleáz (*Hind* III – *Nco* I, *Hind* III – *Not* I, *Bam*H I – *Not* I) a následnou gelovou elektroforézou (viz. kapitola 3.2.2). Plasmid se správnou velikostí naštěpených fragmentů byl transformován do *E. coli* GM2929 (viz. kapitoly 3.1.1 a 3.2.3). Transformované buňky byly selektovány na LA médiu s ampicilinem. Plasmid pPMQ byl izolován pomocí komerčně dodávané sady JETQUICK (viz. kapitola 3.2.1). Kvalita a správnost izolovaného plasmidu byla ověřena štěpením různými kombinacemi restričních endonukleáz (*Hind* III – *Nco* I, *Hind* III – *Not* I, *Bam*H I – *Not* I) a následnou gelovou elektroforézou (viz. kapitola 3.2.2). Plasmid se správnou velikostí naštěpených fragmentů byl použit k transformaci protoplastů *Streptomyces nodosus* ssp. *asukaensis* (*asuC13* ::*apr*^R).



Obr. 16: Příprava plasmidu pPMQ. (A) provedení „in-frame“ delecce *Afe* I – *Not* I na plasmidu pMQ06, vznik plasmidu pMQ06-del. (B) přenos „in-frame“ delecce a okolní sekvence do vektoru pGM160, vznik plasmidu pPMQ.

4.1.3 Homologní rekombinace ve *Streptomyces nodosus* ssp. *asukaensis* (*asuC13* ::*apr*^R)

Z kmenu *Streptomyces nodosus* ssp. *asukaensis* (*asuC13*::*apr*^R) (viz. kapitola 3.1.1) byly připraveny protoplasty. Ty byly transformovány plasmidem pPMQ (Obr. 16) izolovaným z *E. coli* GM2929 (viz. kapitola 4.1.2). Transformované buňky byly selektovány na R5 médiu, které bylo přelito roztokem thiostreptonu (viz. kapitola 3.2.3). Přítomnost plasmidu pPMQ byla ověřena zpětnou izolací plasmidové DNA pomocí metody alkalické lyze a fenolové precipitace (viz. kapitola 3.2.1). Kvalita a správnost izolovaného plasmidu byla ověřena štěpením různými kombinacemi restričních endonukleáz (*Hind* III – *Nco* I, *Hind* III – *Not* I, *Bam*H I – *Not* I) a následnou gelovou elektroforézou (viz. kapitola 3.2.2). Transformované buňky nesoucí správný plasmid byly použity pro přípravu mutantního kmenu *Streptomyces nodosus* ssp. *asukaensis* Δ *asuC13*–*C14* pomocí homologní rekombinace (viz. kapitola 3.2.4) (Obr. 17). Celkem byly vyselektovány dva apramycin-senzitivní kmeny. U nich byla ověřena správnost proběhlé rekombinace pomocí hybridizace s DNA neradioaktivně značenou próbou, PCR reakce a následnou sekvenací PCR produktu.



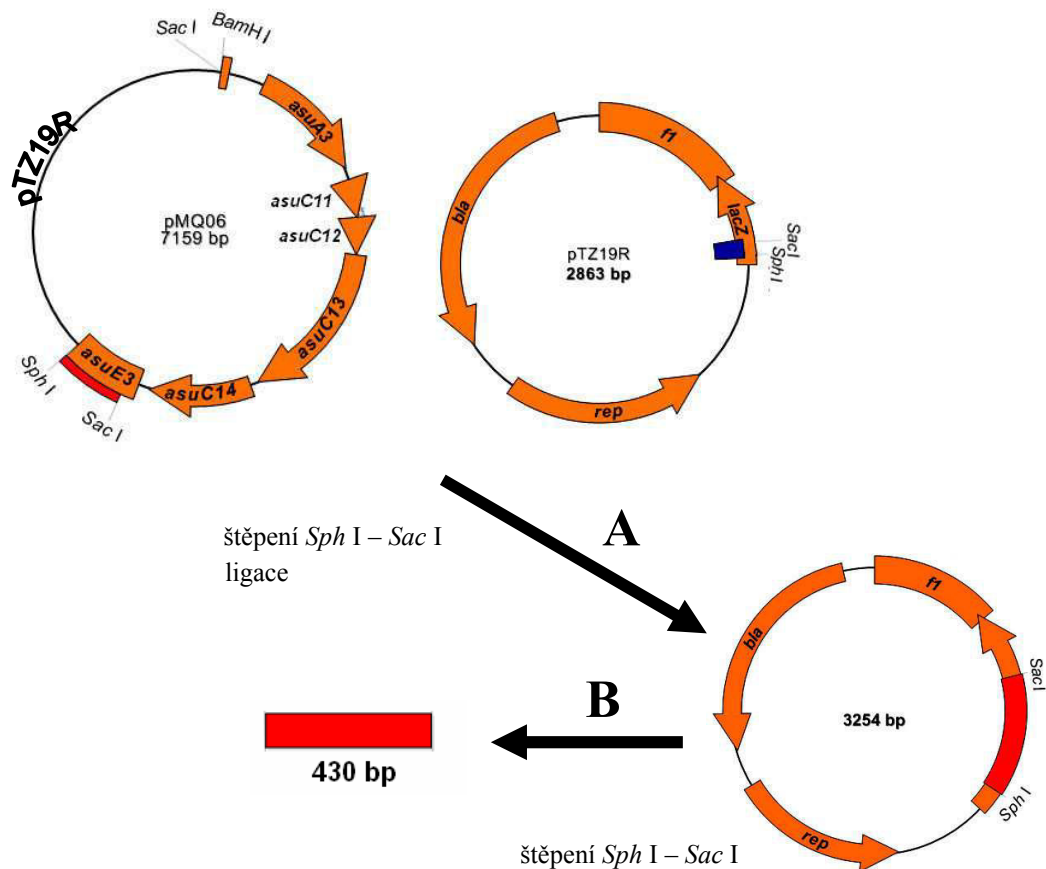
Obr. 17: Schéma homologní rekombinace proběhlé ve *Streptomyces nodosus* ssp. *asukaensis* (*asuC13* ::*apr*^R) za pomoci plasmidu pPMQ. Horní sekvence ukazuje biosyntetický shluk asukamycinu v oblasti genů *asuM1*–*asuD3* v chromozómu mutantního kmenu *Streptomyces nodosus* ssp. *asukaensis* (*asuC13* ::*apr*^R), spodní sekvence ukazuje plasmid pPMQ. (A) označuje dva homologní rekombinující úseky. (B) označuje oblast mezi rekombinujícími úseky, která bude z chromozómu homologní rekombinací deletována.

4.1.4 Ověření správnosti proběhlé homologní rekombinace

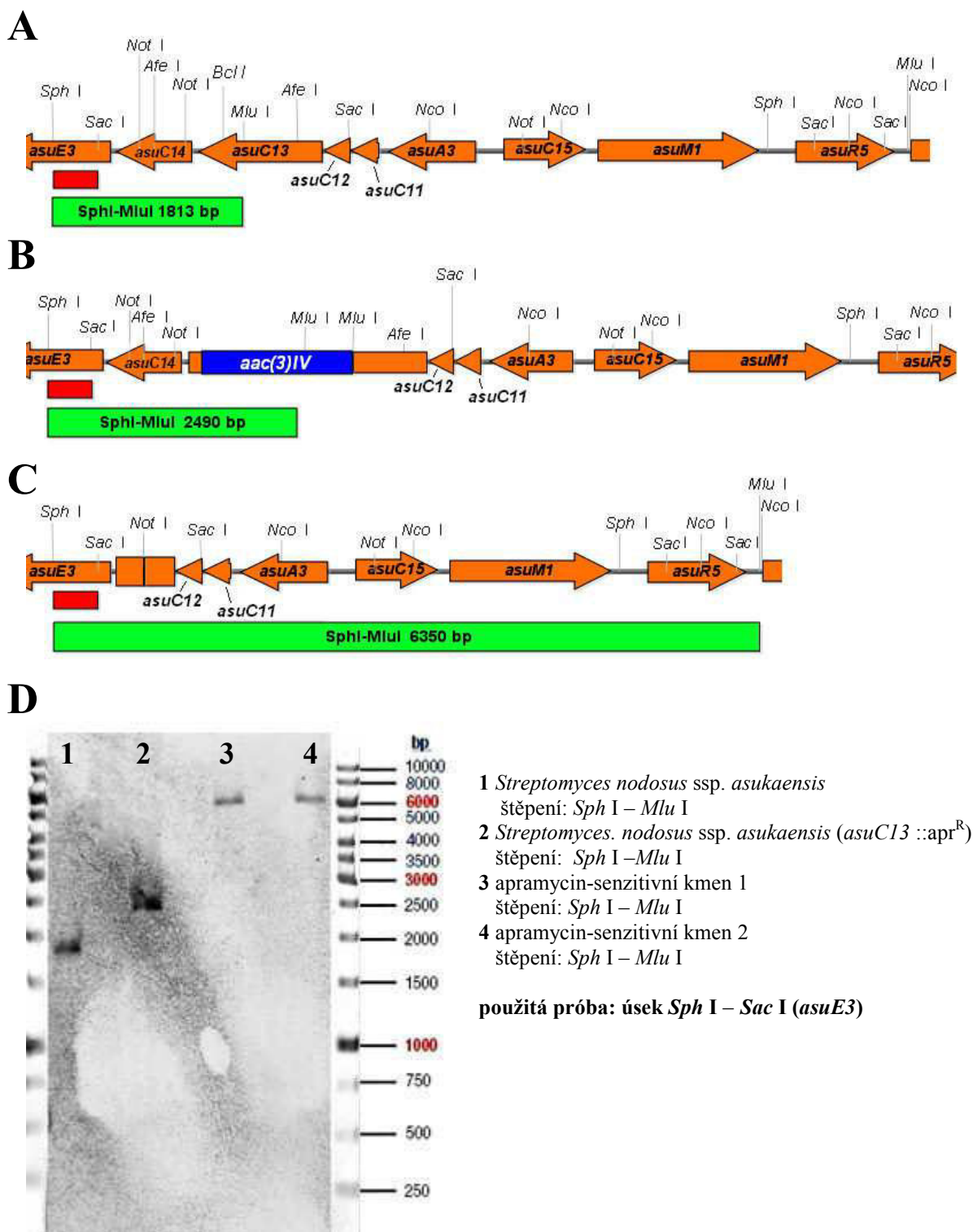
Plasmid pMQ06 (1 μg DNA) a vektor pTZ19R (viz. kapitola 3.1.2) byly štěpeny kombinací restričních endonukleáz *Sph* I – *Sac* I. Tyto restriční směsi byly naneseny na gelovou elektroforézu a z gelu byly izolovány DNA fragmenty o velikosti 430 bp v případě pMQ06 a asi 2800 bp v případě pTZ19R (viz. kapitola 3.2.2). Fragmenty byly společně ligovány (viz. kapitola 3.2.2) (Obr. 18). Ligační směsi byly transformovány kompetentní buňky *E. coli* XL1-Blue (viz. kapitola 3.2.3). Transformované buňky byly selektovány na LA médiu s ampicilinem, X-gal a IPTG. Byly vybrány kolonie nesoucí rekombinantní plasmid (bílé). Z nich byla izolována plasmidová DNA pomocí „boiling“ lyze (viz. kapitola 3.2.1). Izolovaná plasmidová DNA byla zakoncentrována do celkového objemu 8 μl pomocí metody srážení etanolem (viz. kapitola 3.2.2). Koncentrovaná plasmidová DNA byla štěpena kombinací restričních endonukleáz *Sph* I – *Sac* I. Tato restriční směs byla nanesena na gelovou elektroforézu a z gelu byl izolován DNA fragment o velikosti 430 bp

(viz. kapitola 3.2.2) (Obr. 18). Tento izolovaný fragment byl použit pro přípravu DNA neradioaktivně značené próby (viz. kapitola 3.2.2).

Ze dvou vyselektovaných apramycin-senzitivních kmenů a z původního mutantního kmenu *Streptomyces nodosus* ssp. *asukaensis* (*asuC13::apr^R*) byla izolována chromozomální DNA (viz. kapitola 3.2.1). Chromozomální DNA (3 μg DNA) ze dvou vyselektovaných apramycin-senzitivních kmenů, mutantního kmenu *Streptomyces nodosus* ssp. *asukaensis* (*asuC13::apr^R*) a divokého kmenu *Streptomyces nodosus* ssp. *asukaensis* (viz. kapitola 3.1.3) byly následně naštěpeny kombinací restričních endonukleáz *Sph* I – *Mlu* I. Tyto restriční směsi byly naneseny na gelovou elektroforézu a následně přeneseny na nylonovou membránu metodou „Southern blotting“ (viz. kapitola 3.2.2). Membrána byla hybridizována s vytvořenou DNA neradioaktivně značenou próbou (Obr. 18, 19) (viz. kapitola 3.2.2). Výsledek hybridizace ukázal významné rozdíly sekvence chromozomální DNA v oblasti genů *asuC13–C14* mezi jednotlivými kmeny. Velikost označených fragmentů u chromozomální DNA divokého kmenu *Streptomyces nodosus* ssp. *asukaensis* se shodovala s teoretickou velikostí vypočtenou podle genové mapy. Stejně tak se shodovala velikost označených fragmentů u DNA izolované z mutantního kmenu *Streptomyces nodosus* ssp. *asukaensis* (*asuC13::apr^R*) a ze dvou vyselektovaných apramycin-senzitivních kmenů. U obou připravených apramycin-senzitivních kmenů byla velikost označených DNA fragmentů stejná (Obr. 19). K přesnějšímu ověření správnosti proběhlé rekombinace byl použit pouze připravený apramycin-senzitivní kmen číslo jedna.



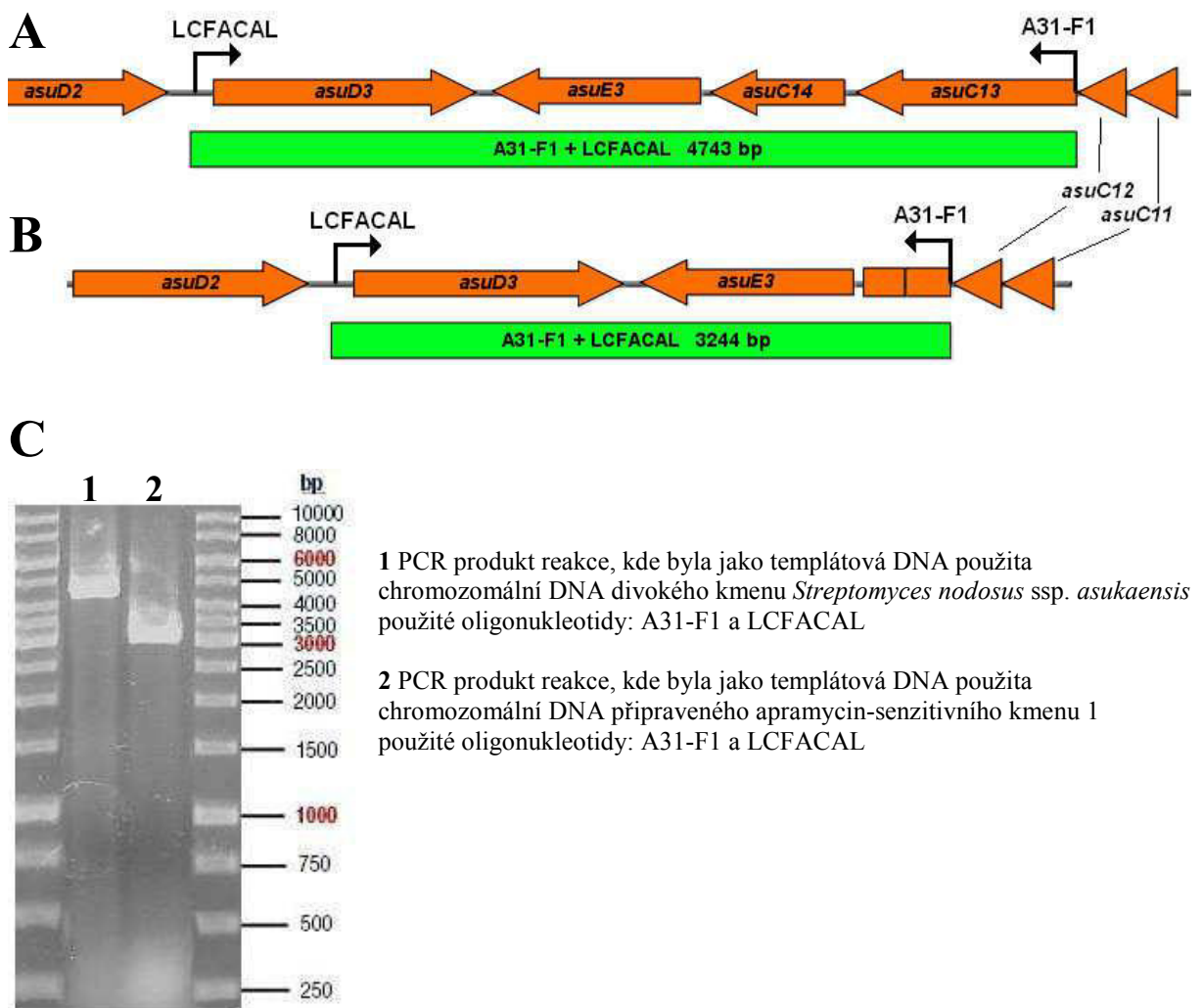
Obr. 18: Příprava DNA fragmentu pro neradioaktivně značenou DNA próbu. (A) zaklonování DNA fragmentu *Sph* I – *Sac* I do pTZ19R štěpeného *Sph* I – *Sac* I, (B) vyštěpení fragmentu *Sph* I – *Sac* I pro přípravu neradioaktivně značené DNA próby.



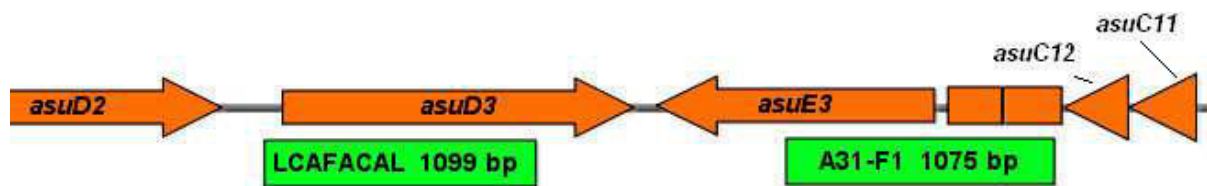
Obr. 19: Ověření správnosti proběhlé homologní rekombinace pomocí DNA hybridizace. (A) úsek biosyntetického shluku asukamycinu v oblasti genů *asuE3*–*asuR5* v chromozómu divokého kmenu *Streptomyces nodosus* ssp. *asukaensis*, (B) stejný úsek v chromozómu mutantního kmenu *Streptomyces nodosus* ssp. *asukaensis* (*asuC13* ::*apr*^R), (C) stejný úsek DNA v chromozómu připraveného mutantního kmenu *Streptomyces nodosus* ssp. *asukaensis* Δ *asuC13*–*C14* (apramycin-senzitivní kmen 1 a 2). Červeně je označena sekvence neradioaktivně značené DNA próby použité pro DNA hybridizaci. Modře je označen gen *aac(3)IV* zajišťující apramycinovou rezistenci. Zeleně jsou označeny předpokládané fragmenty označené neradioaktivně značenou DNA próbou při DNA hybridizaci při štěpení dané chromozomální DNA kombinací restričních endonukleáz *Sph* I – *Mlu* I. (D) výsledek DNA hybridizace s neradioaktivně značenou próbou.

Chromozomální DNA připraveného apramycin-senzitivního kmenu číslo jedna a divokého kmenu *Streptomyces nodosus* ssp. *asukaensis* byly použity jako templáty pro PCR reakce s použitou kombinací oligonukleotidů A31-F1 a LCAFACAL (viz. kapitoly 3.1.6, 3.2.2). 5 µl od obou PCR produktů bylo nanášeno na gelovou elektroforézu (viz. kapitola 3.2.2). Velikost produktu PCR reakce, jejímž templátem byla chromozomální DNA divokého kmenu byla asi 4700 bp. V případě PCR reakce jejímž templátem byla chromozomální DNA připraveného mutantního apramycin-senzitivního kmenu byla velikost produktu asi 3200 bp. V obou případech se velikost shodovala s teoretickou velikostí vypočítanou podle genové mapy (Obr. 20).

Zbytek produktu PCR reakce s chromozomální DNA připraveného apramycin-senzitivního kmenu byl zpracován jako vzorek pro sekvenaci DNA a osekvenován za použití oligonukleotidů LCAFACAL a A31-F1 (viz. kapitola 3.2.2). Získaná sekvence PCR produktu zcela odpovídala teoretické sekvenci podle genové mapy (Obr. 21).



Obr. 20: Ověření správnosti proběhlé homologní rekombinace pomocí PCR reakce. Zeleně jsou označeny předpokládané produkty PCR reakce. (A) úsek biosyntetického shľuku asukamycinu v oblasti genů *asuD2*–*asuC11* v chromozómu divokého kmenu *Streptomyces nodosus* ssp. *asukaensis*. Umístění použitých oligonukleotidů pro PCR reakci. (B) stejný úsek DNA předpokládaný v chromozómu připraveného mutantního kmenu *Streptomyces nodosus* ssp. *asukaensis* Δ *asuC13*–*C14*. Umístění použitých oligonukleotidů pro PCR reakci. (C) produkty PCR reakce nanášené na agarózovou elektroforézu.



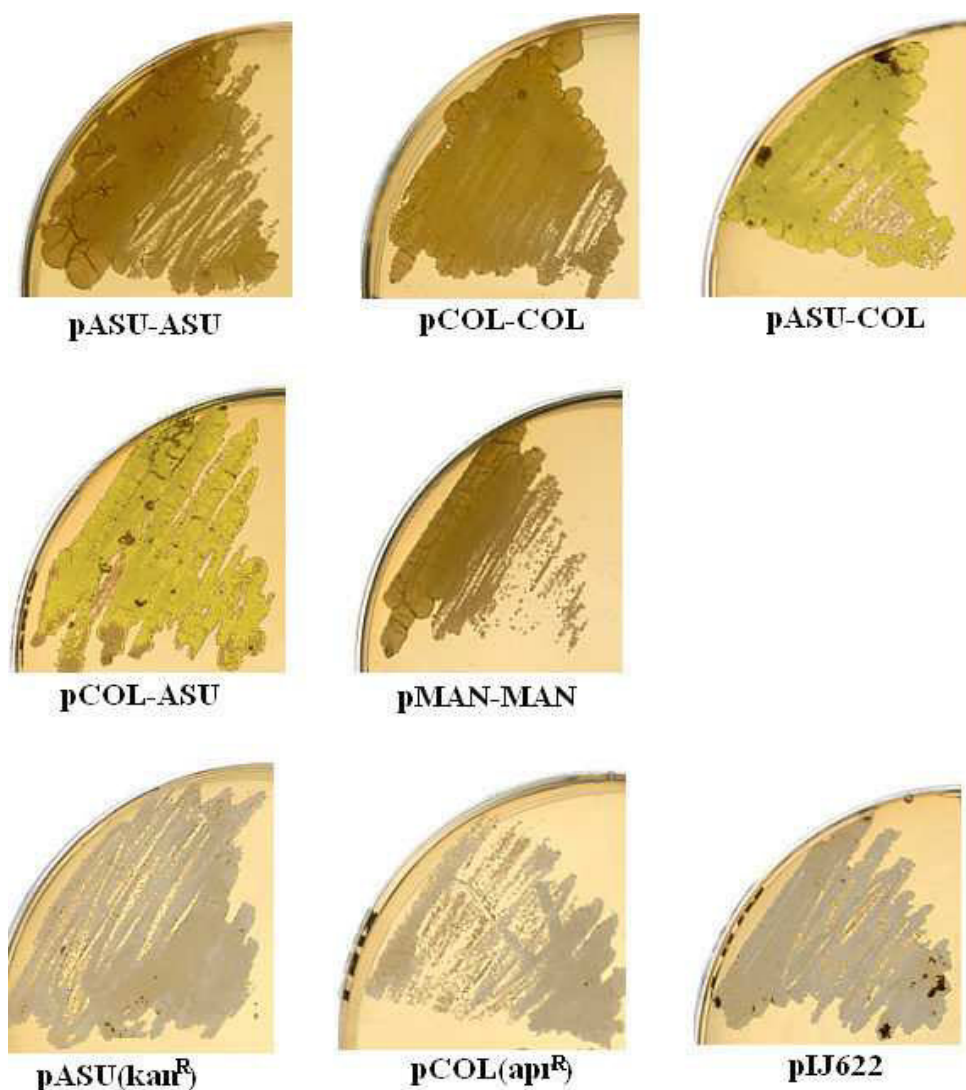
Obr. 21: Ověření správnosti proběhlé homologní rekombinace sekvenací PCR produktu. Je zobrazen předpokládaný vzniklý úsek biosyntetického shluku asukamycinu v oblasti genů *asuD2*–*asuC11* v chromozómu připraveného mutantního kmenu *Streptomyces nodosus* ssp. *asukaensis* Δ *asuC13*–*C14*. Zeleně jsou označeny sekvence produktů sekvenační reakce při použití oligonukleotidů LCAFACAL a A31-F1, jejich velikost a přesné umístění těchto sekvencí v genové mapě.

4.2 Komplementace delece genů *asuC13*–*C14* a analýza produkovaných sekundárních metabolitů

U připraveného mutantního kmenu *Streptomyces nodosus* ssp. *asukaensis* Δ *asuC13*–*C14* byla provedena komplementace delece vložením plasmidů, které nesou geny *C13*–*C14*, popř. pouze gen *C13* (společně s geny pro ACP proteiny) z přírodních producentů asukamycinu, colabomycinu E a manumycinu A. Tyto geny byly vloženy do streptomycetového vektoru pIJ622 s vloženým ermE* konstitutivním promotorem (viz. kapitola 3.1.2). Mutantní kmen transformovaný samotným vektorem pIJ622 byl použit jako negativní kontrola. Z transformovaných kmenů byly izolovány sekundární metabolity metodou etylacetát/chloroformové extrakce a tyto extrakty byly dále podrobeny TLC a HPLC-DAD-ToFMS analýze. Během analýz byla zkoumána přítomnost asukamycinu a predikované nově vznikající látky, kterou je asukamycin s delším, tetraenovým (osmiuhlíkovým) spodním řetězcem („asukamycin-tetraen“) (Obr. 24).

4.2.1 Transformace mutantního kmenu *Streptomyces nodosus* ssp. *asukaensis* Δ *asuC13*–*C14* sadou plasmidů pro komplementaci delece

Z připraveného mutantního kmenu *Streptomyces nodosus* ssp. *asukaensis* Δ *asuC13*–*C14* (apramycin-senzitivní kmen jedna) byly připraveny protoplasty. Ty byly transformovány plasmidy pASU-ASU, pCOL-COL, pASU-COL, pCOL-ASU, pASU(kan^R), pCOL(apr^R), pMAN-MAN a pIJ622 (viz. kapitola 3.1.2). Transformované buňky byly selektovány na R5 médiu, které bylo přelito roztokem thiostreptonu (viz. kapitola 3.2.3). Přítomnost plasmidů byla ověřena zpětnou izolací plasmidové DNA pomocí metody alkalické lyze a fenolové precipitace (viz. kapitola 3.2.1). Kvalita a správnost izolovaných plasmidů byla ověřena štěpením restriktčními endonukleázami v místě vložení kazety genů do vektoru pIJ622 (*EcoR* I – *Bgl* II nebo *Bgl* II) (viz. kapitola 3.1.2) a následnou gelovou elektroforézou (viz. kapitola 3.2.2). Buňky transformované plasmidy pASU-ASU, pCOL-COL, pASU-COL, pCOL-ASU a pMAN-MAN vykazovaly při přeočkování na MH médium výraznou produkci žlutých pigmentů (Obr. 22). Transformované buňky nesoucí správný plasmid byly použity pro extrakci sekundárních metabolitů.



Obr. 22: Mutantní kmen *Streptomyces nodosus* ssp. *asukaensis* Δ *asuC13–C14* transformovaný plasmidy pASU-ASU, pCOL-COL, pASU-COL, pCOL-ASU, pASU(kan^R), pCOL(apr^R) a pIJ622 na MH médiu s thiostreptonem ve fázi vzdušného mycelia těsně před produkcí exospor. Produkce žlutých pigmentů u kmenů nesoucích plasmid pASU-ASU, pCOL-COL, pASU-COL, pCOL-ASU a pMAN-MAN.

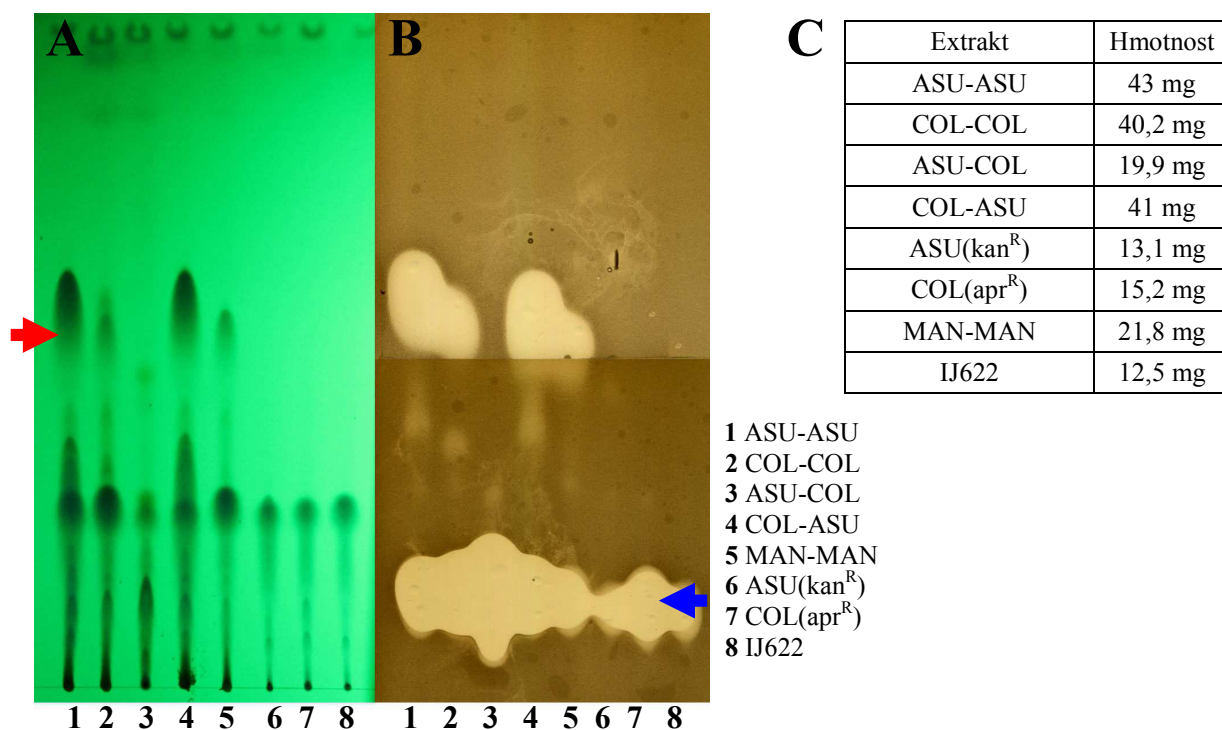
4.2.2 Extrakce a analýza sekundárních metabolitů v transformovaných buňkách

U kmenů *Streptomyces nodosus* ssp. *asukaensis* Δ *asuC13–C14* transformovaných plasmidy pASU-ASU, pCOL-COL, pASU-COL, pCOL-ASU, pASU(kan^R), pCOL(apr^R), pMAN-MAN a pIJ622 (viz. kapitola 3.1.2) byla provedena etylacetát/chloroformová extrakce sekundárních metabolitů (viz. kapitola 3.2.5). Extrakty byly pojmenovány podle plasmidu, kterým byl transformován mutantní kmen (ASU-ASU, COL-COL, ASU-COL, COL-ASU, ASU(kan^R), COL(apr^R), MAN-MAN a IJ622). Celkem byly ze vzorků získány extrakty o hmotnostech v rozmezí 12,5–43 mg (Obr. 23). Ty byly dále použity k analýze pomocí chromatografie na tenké vrstvě (TLC).

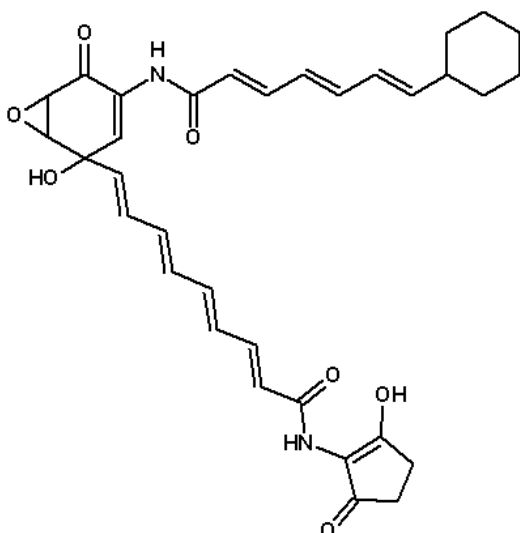
K TLC analýze (viz. kapitola 3.2.5) bylo použito 10 μ l extraktu ASU-ASU, COL-COL, COL-ASU, ASU(kan^R), COL(apr^R), MAN-MAN a IJ622. Extraktu ASU-COL bylo použito 50 μ l. TLC byla provedena ve dvou stejných kopiích. Jedna byla použita pro detekci sekundárních metabolitů pod ultrafialovým světlem a druhá pro biologický test přítomnosti antimikrobiálních látek (viz. kapitola 3.2.5). Při ozáření tenké vrstvy ultrafialovým světlem se ukázala v drahách vzorků jedna až dvě výrazné tmavé skvrny (viz. kapitola 3.2.5). Tmavé

skvrny ležící v předpokládané pozici manumycinových antibiotik se objevily u extraktů ASU-ASU, COL-COL, COL-ASU a MAN-MAN. U extraktu ASU-COL se objevila poblíž předpokládané pozice manumycinových antibiotik nejasná tmavá skvrna (Obr. 23). Na biologickém testu se vytvořily u jednotlivých vzorků jedno až dvě místa se silnou inhibicí růstu bakterie *Bacillus subtilis* (viz. kapitola 3.2.5). Inhibiční zóny růstu ležící v předpokládané pozici manumycinových antibiotik se objevily u extraktů ASU-ASU, COL-COL, COL-ASU a MAN-MAN (Obr. 23). Extrakty ASU-ASU, COL-COL, ASU-COL, COL-ASU, MAN-MAN a ASU(kan^R) byly dále podrobeny UHPLC-DAD-ToFMS analýze.

Při HPLC-DAD analýze (viz. kapitola 3.2.5) byl detekován výrazný pík v čase předpokládané eluce asukamycinu u extraktů ASU-ASU, COL-COL, ASU-COL, COL-ASU a MAN-MAN (Obr. 25). Výrazný pík v čase předpokládané eluce asukamycinu s tetraenovým spodním řetězcem („asukamycin-tetraenu“) (Obr. 24) byl detekován u extraktu COL-COL (Obr. 25). U extraktu ASU(kan^R) nebyl detekován ani jeden z těchto píků. Extrakty ASU-ASU, COL-COL, ASU-COL, COL-ASU, MAN-MAN a ASU(kan^R) byly dále podrobeny HPLC-ToFMS analýze (viz. kapitola 3.2.5). Asukamycin byl detekován ve vzorcích s charakteristickými MS spektry o m/z 545,2268 (v negativním ionizačním módu, ESI⁻), což odpovídá elementárnímu složení C₃₁H₃₄N₂O₇ s chybou hmoty $\Delta = -3,7$ ppm (ESI⁻) a chybou i-FIT(norm) = 0,2 (ESI⁻). „Asukamycin-tetraen“ (Obr. 24) byl detekován ve vzorcích s charakteristickými MS spektry o m/z 571,2421 (v ESI⁻), což odpovídá elementárnímu složení C₃₃H₃₆N₂O₇ s chybou hmoty $\Delta = -4,0$ ppm (ESI⁻) a chybou i-FIT(norm) = 0,3 (ESI⁻). Přítomnost asukamycinu byla HPLC-ToFMS analýzou prokázána v extraktech ASU-ASU, COL-COL, ASU-COL, COL-ASU a MAN-MAN (Obr. 26). Přítomnost „asukamycin-tetraenu“ byla prokázána v extraktech COL-COL a ASU-COL (Obr. 26). Koncentrace asukamycinu (dle výsledků HPLC-DAD a HPLC-ToFMS) byla v těchto extraktech vždy podstatně vyšší, než koncentrace „asukamycin-tetraenu“ (Obr. 25, Tab. 1).

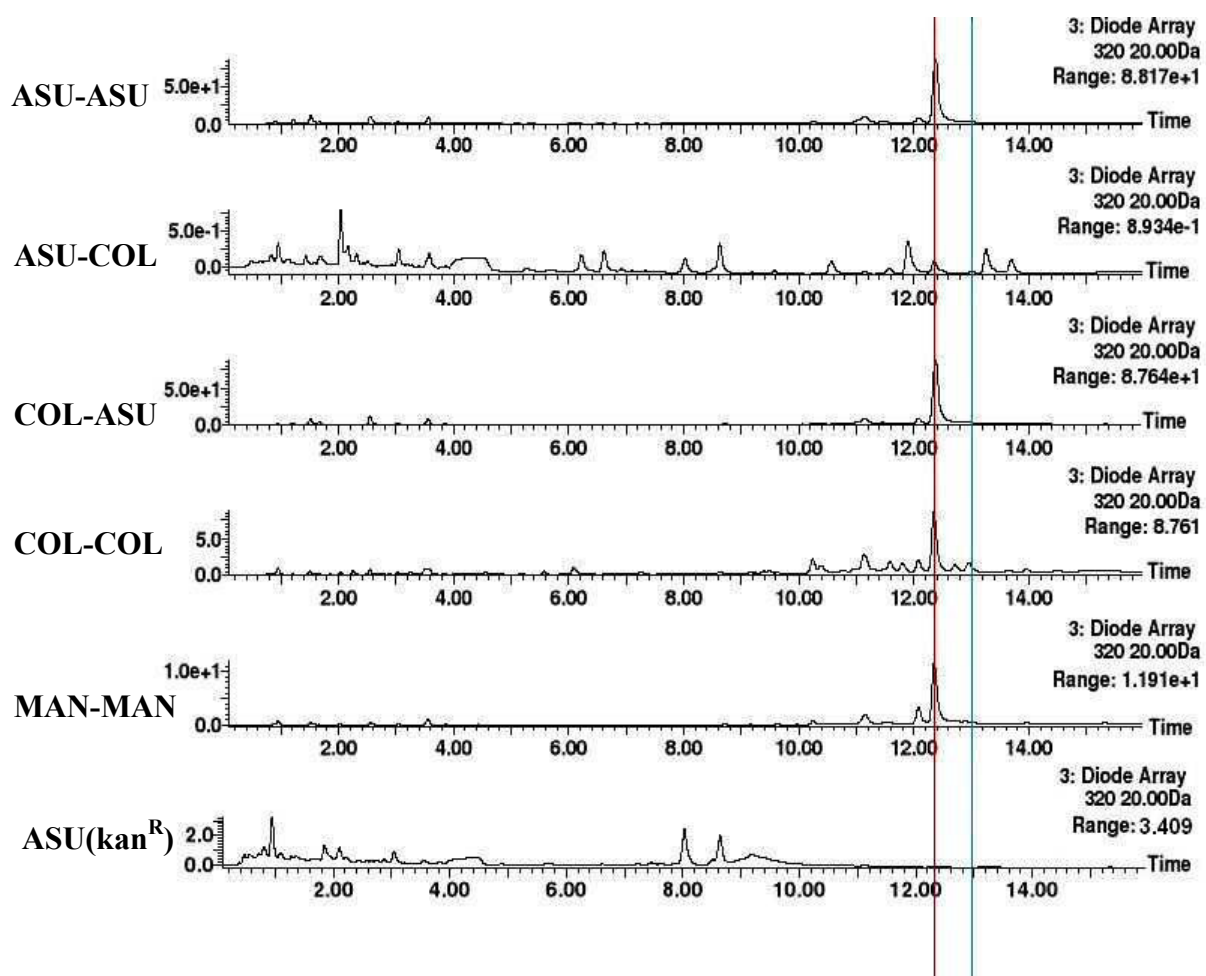


Obr. 23: TLC analýza a následný biologický test přítomnosti biologicky aktivních látek. (A) tenká vrstva ozářená ultrafialovým světlem (vlnová délka 254 nm). (B) biologický test přítomnosti biologicky aktivních látek. Čísła vyjadřují nanosený extrakt v dané dráze. Červená šipka ukazuje předpokládané místo výskytu manumycinových antibiotik na tenké vrstvě, modrá šipka ukazuje místo výskytu thiostreptonu (přidaného do média při kultivaci) na tenké vrstvě. (C) hmotnost získaných extraktů.

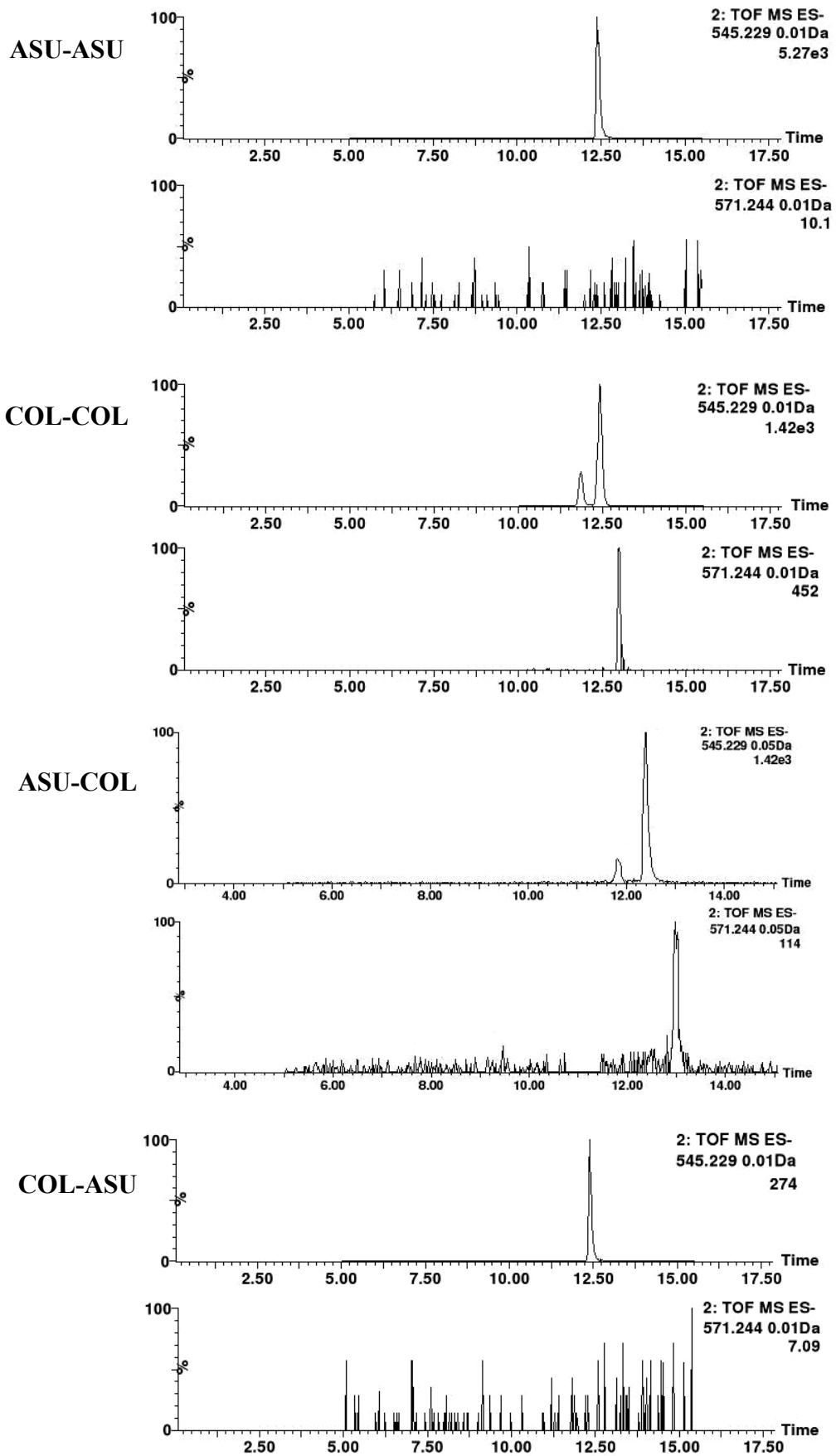


„Asukamycin-tetraen“ ($C_{33}H_{36}N_2O_7$)

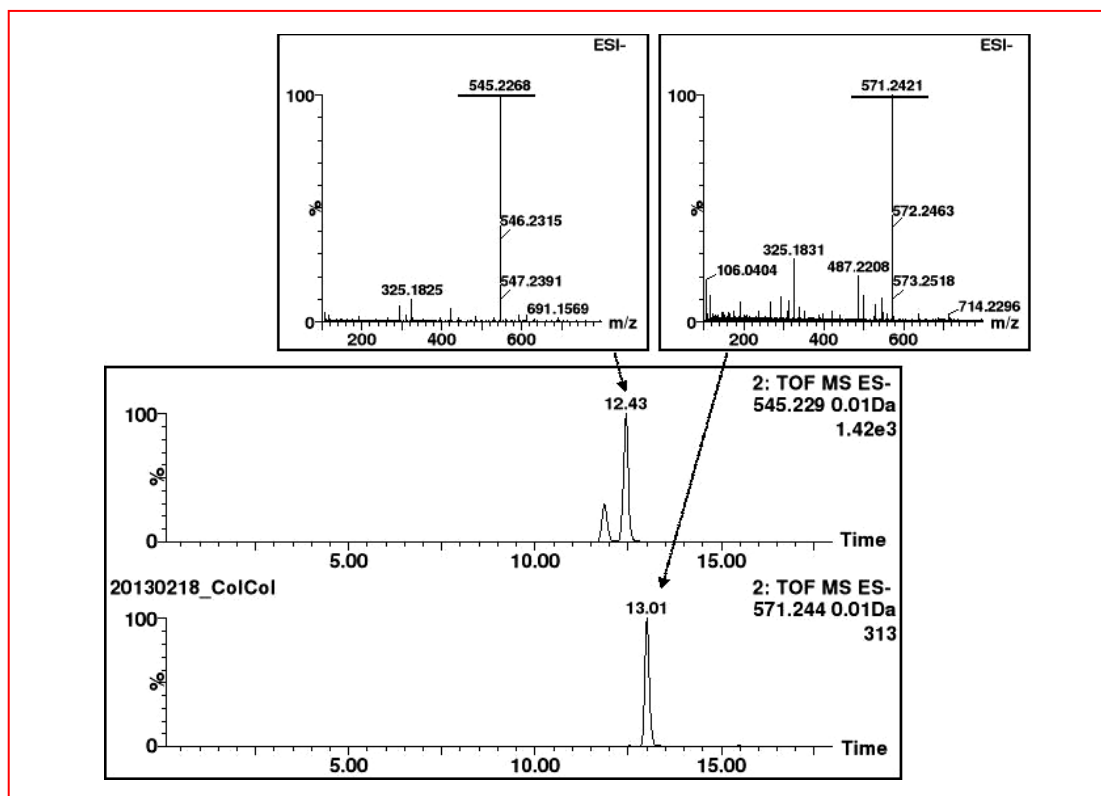
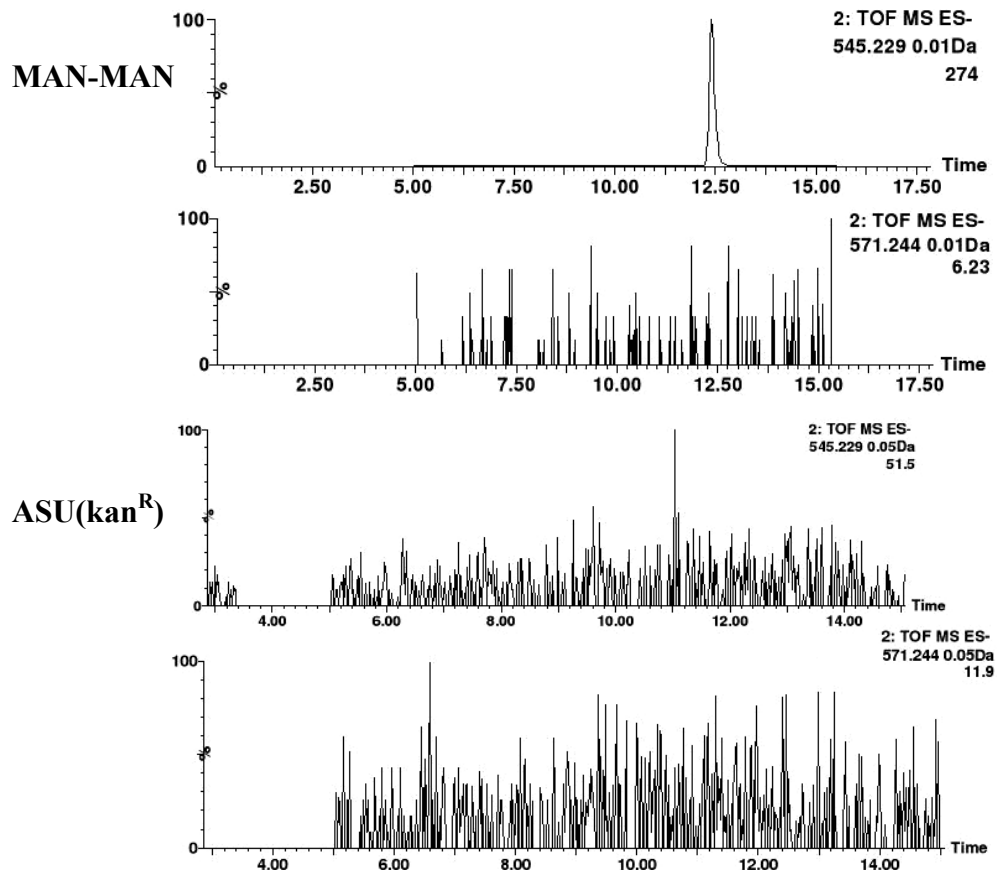
Obr. 24: Předpokládaná struktura nově připraveného manumycinového antibiotika „asukamycin-tetraenu“ a jeho sumární vzorec.



Obr. 25: Výsledek HPLC-DAD analýzy extraktů ASU-ASU, ASU-COL, COL-ASU, COL-COL, MAN-MAN a ASU(kan^R). Osa X ukazuje retenční čas (tR), osa Y ukazuje absorbanci zachycenou detektorem diodového pole (DAD) při vlnové délce 320 nm. Červeně je označen teoretický retenční čas asukamycinu, modře je označen teoretický retenční čas „asukamycin-tetraenu“.



Obr. 26: Pokračování a popis na další straně



Obr. 26: Výsledky UHPLC-ToFMS analýzy extraktů ASU-ASU, COL-COL, ASU-COL, COL-ASU, MAN-MAN a ASU(kan^R). První graf vždy ukazuje detekci látek odpovídající hmotě asukamycinu, druhý „asukamycin-tetraenu“. Osa X ukazuje retenční čas (tR), osa Y ukazuje intenzitu detekce látky o dané hmotě (545,229 u asukamycinu, 571,244 u asukamycin-tetraenu“) hmotnostním detektorem. Specifické [M-H]⁻ ionty náležící dvěma sledovaným analytům byly extrahovány s hmotnostním oknem o šířce 0,01 Da. Červeně je označeno zaostření oblastí píku asukamycinu a „asukamycin-tetraenu“ v extraktu COL-COL, demonstrující přítomnost látek ve vzorku a jejich příslušná MS spektra.

Extrakt	intenzita píku (IU)	
	asukamycin	„asukamycin-tetraen“
ASU-ASU	3460	0
COL-COL	2970	427
ASU-COL	285	25
COL-ASU	5203	0
MAN-MAN	2310	0
ASU(kan ^R)	0	0

Tab. 1: Přítomnost asukamycinu a „asukamycin-tetraenu“ dle HPLC-ToFMS v extraktech. Hodnoty označují naměřenou intenzitu píků v MS v jednotkách IU („Intensity Units“).

5. Diskuze

Délka polyketidových řetězců je jedním z hlavních faktorů, který ovlivňuje celkovou strukturu polyketidových látek a tím také např. jejich potenciálně využitelné biologické účinky. V minulosti byly již poměrně dobře popsány faktory ovlivňující délku syntetizovaného řetězce u velkého množství aromatických bakteriálních polyketidů, jakými jsou např. actinorhodin či tetracenomycin. Tyto látky jsou, stejně jako polyketidové řetězce manumycinových antibiotik, syntetizovány iterativní PKS II a délka jejich řetězců byla prozatím popsána v rozmezí hexaketidu (během jejich biosyntézy proběhne celkem 6 kondenzací malonyl-CoA) až pentadekaketidu (patnáct kondenzací). Jako faktor zodpovědný za délku řetězce byl u těchto látek označen CLF protein, který tvoří během jejich biosyntézy heterodimer s fukční β -ketoacylsyntázou typu I/II (KS I/II). V případě manumycinových antibiotik, které mají výrazně kratší polyketidové řetězce (diketid až tetraketid), prozatím nebyl objeven žádný mechanismus regulující délku jejich řetězců. Při analýze biosyntetického shluku asukamycinu byl popsán gen *asuC14*, jehož produkt se v mnoha ohledech podobá CLF a KS aromatických bakteriálních polyketidů (Rui *et al.* 2010). Geny homologní s *asuC14* byly objeveny také v biosyntetickém shluku colabomycinu E a manumycinu A (Petříček *et al.* – nepublikovaná data). Vznikl tedy předpoklad, že právě produkty genů *asu/col/manC14* by mohly být faktory zodpovědné za regulaci délky spodních polyketidových řetězců u manumycinových antibiotik. V tomto případě by se jednalo o zcela novou rodinu dosud nepopsaných CLF.

Cílem této diplomové práce bylo potvrdit tuto úlohu genu *C14* v biosyntéze manumycinových antibiotik a případně využít funkce produktů těchto genů k vytvoření nového manumycinového antibiotika, které se od asukamycinu liší délkou spodního řetězce („asukamycin-tetraenu“). Výsledky byly porovnávány s další, prozatím nedokončenou prací, ve které byla zkoumána produkce manumycinových antibiotik připraveným „in-frame“ mutantem producenta colabomycinu E *Streptomyces* SOK1/5-4 Δ *colC11–C14*, který byl následně transformován stejnými plasmidy jako mutantní kmen připravený v této diplomové práci (Petříček *et al.* – nepublikovaná data).

Pro zkoumání funkce genů *asu/col/manC14* byl vytvořen pomocí homologní rekombinace mutantní kmen *Streptomyces nodosus* ssp. *asukaensis* Δ *asuC13–C14*, který nese „in-frame“ delecii v oblasti genů *asuC13–C14* v biosyntetickém shluku asukamycinu na bakteriálním chromozómu. Provedení „in-frame“ delecce bylo zvoleno z důvodu předpokládaného uspořádání genů *asuC13* a *C14* do jedné transkripční jednotky společně s dalšími geny, jejichž funkce takto nebyla narušena a nedošlo ke zkreslení výsledků. Vytvořený mutant nevykazoval při růstu na MH médiu narozdíl od divokého kmenu *Streptomyces nodosus* ssp. *asukaensis* produkci žlutých pigmentů. Lze tedy předpokládat, že u něho nedocházelo k produkci žádného manumycinového antibiotika. To je v souladu s předchozími výsledky, kdy bylo ukázáno, že přítomnost genu *asuC13*, který kóduje KS I/II, je esenciální pro biosyntézu asukamycinu (Rui *et al.* 2010).

Delece genů *asuC13* a *C14* byla následně komplementována pomocí plasmidů nesoucích geny pro ACP proteiny (*C11* a *C12*) a geny *C13* a *C14* z přírodních producentů asukamycinu, colabomycinu E a manumycinu A. Tyto geny byly konstitutivně transkribovány za pomoci silného ermE* promotoru na plasmidech odvozených od pIJ622. Připravený mutantní kmen *Streptomyces nodosus* ssp. *asukaensis* Δ *asuC13–C14* transformovaný plasmidem pIJ622 byl použit jako negativní kontrola. Tento kmen nevykazoval produkci žlutých pigmentů na MH médiu, ani u něho nebyla prokázána produkce manumycinových antibiotik pomocí TLC analýzy. Tím bylo potvrzeno, že mutantní kmen neprodukuje žádné žluté pigmenty, ani v případě, kdy nese plasmid pIJ622.

U připraveného mutantního kmenu *Streptomyces nodosus* ssp. *asukaensis* Δ *asuC13*–*C14*, který byl transformován plasmidem pASU-ASU došlo podle našich očekávání k obnovení produkce asukamycinu. Plasmid nesl kompletní sadu genů pro ACP a geny *asuC13* a *C14* pouze z přírodního producenta asukamycinu. Geny nesené na plasmidu byly tedy v připraveném mutantním kmenu v pořádku exprimovány a potvrdila se funkčnost celého navrženého systému. Výsledek potvrzující funkčnost navrženého systému byl pozorován i u mutantního kmenu *Streptomyces* SOK1/5-4 Δ *colC11*–*C14*, který byl transformován plasmidem pCOL-COL (odpovídá pASU-ASU u producenta asukamycinu). Zde také došlo ke komplementaci mutace a v extraktu byla detekována přítomnost colabomycinu E, jako jediného manumycinového antibiotika (Petříček *et al.* – nepublikovaná data).

Obnovení produkce asukamycinu bylo prokázáno také u připraveného mutantního kmenu *Streptomyces nodosus* ssp. *asukaensis* Δ *asuC13*–*C14* transformovaného plasmidem pMAN-MAN. V tomto případě plasmid nesl geny pro ACP proteiny a geny *manC13* a *C14* pouze z přírodního producenta manumycinu A, který má identickou strukturu spodního polyketidového řetězce jako asukamycin. Oba biosyntetické operony jsou tedy dle předpokladu navzájem funkčně zaměnitelné. V obou případech produkty těchto genů využívají pro biosyntézu stejnou startovací jednotku (aktivovanou 3,4-AHBA) i stejné prodlužovací jednotky (malonyl-CoA). Jelikož jediným produkovaným manumycinovým antibiotikem byl asukamycin, bylo expresí genů *manC13* a *manC14* v připraveném mutantním kmenu ověřeno, že se produkty genů *C13* a *C14* nepodílejí žádným způsobem na biosyntéze horního řetězce, kterým se navzájem manumycin A a asukamycin odlišují. To je v souladu s předchozí prací (Rui *et al.* 2010).

U připraveného mutantního kmenu *Streptomyces nodosus* ssp. *asukaensis* Δ *asuC13*–*C14* transformovaného plasmidem pASU(kan^R) nebyla detekována produkce žádného manumycinového antibiotika. Plasmid nesl stejně jako pASU-ASU geny pro ACP proteiny a pro KS I/II (*asuC13*) z přírodního producenta asukamycinu. Postrádal však zcela gen *asuC14* pro potenciální CLF. Tímto výsledkem bylo potvrzeno, že produkt genu *asuC14* je pro biosyntézu asukamycinu v jeho producentovi *Streptomyces nodosus* ssp. *asukaensis* esenciální stejně jako gen *asuC13* (Rui *et al.* 2010). U mutantního kmenu *Streptomyces nodosus* ssp. *asukaensis* Δ *asuC13*–*C14* transformovaného plasmidem pCOL(apr^R) taktéž nebyla prokázána produkce žádného manumycinového antibiotika, což potvrzuje závěr, že též přítomnost genu *C14* je pro produkci manumycinových antibiotik esenciální. Produkty genů *C13* (KS I/II) a *C14* (potenciální CLF) tvoří během biosyntézy spodního polyketidového řetězce s největší pravděpodobností podobný funkční heterodimer KS/CLF, jaký byl popsán u bakteriálních aromatických polyketidů (Keatinge-Clay *et al.* 2004).

U připraveného mutantního kmenu *Streptomyces nodosus* ssp. *asukaensis* Δ *asuC13*–*C14* transformovaného plasmidem pCOL-ASU byla detekována produkce asukamycinu, jako jediného manumycinového antibiotika. Plasmid pCOL-ASU nesl geny pro ACP a gen *colC13* z producenta colabomycinu E a gen *asuC14* z producenta asukamycinu. Tímto výsledkem bylo prokázáno, že gen *colC13* (KS I/II), přestože se evidentně zapojil do biosyntézy, není samostatně schopen měnit délku spodního polyketidového řetězce asukamycinu a není tedy faktorem regulujícím délku řetězce. Výsledek dále naznačuje, že produkt genu *colC13* je patrně schopen společně s produktem *asuC14* v producentovi asukamycinu vytvořit funkční heterodimer, přestože se u *colC13* jedná o KS syntetizující standardně delší polyketidový řetězec. To je v souladu s dosud publikovanými pracemi, ve kterých byla u bakteriálních aromatických polyketidů několikrát úspěšně zaměněna původní KS I/II za KS z jiného producenta (McDaniel *et al.* 1993, Burson & Khosla 2000) a také s prací prováděnou paralelně u mutantu *Streptomyces* SOK1/5-4 Δ *colC11*–*C14*. U něho byla po transformaci plasmidem pASU-COL (odpovídá pCOL-ASU u producenta asukamycinu) detekována produkce colabomycinu E, jako jediného manumycinového antibiotika. Detekované množství

produkovaného colabomycinu E bylo však znatelně menší než u ostatních mutantních kmenů (Petříček *et al.* – nepublikovaná data).

U připraveného mutantního kmenu *Streptomyces nodosus* ssp. *asukaensis* Δ *asuC13*–*C14*, transformovaného plasmidem pCOL-COL, byla prokázána produkce asukamycinu a dalšího manumycinového antibiotika, které podle HPLC-ToFMS analýzy odpovídá asukamycinu s delším tetraenovým spodním řetězcem („asukamycin-tetraen“). Plasmid pCOL-COL nesl geny pro ACP proteiny a geny *colC13* a *C14* pouze z přírodního producenta colabomycinu E. Jednalo se tedy o stejné geny jako na plasmidu pCOL-ASU, pouze se záměnou genu *asuC14* za *colC14*. Jelikož narozdíl od kmenu transformovaného plasmidem pCOL-ASU byla u tohoto kmenu prokázána produkce „asukamycin-tetraenu“, bylo tak ověřeno, že na regulaci délky spodního řetězce manumycinových antibiotik se podílí produkt genu *colC14*. Nově získaný „asukamycin-tetraen“ odpovídá podle výsledku ToFMS analýzy námi předpokládané struktury hybridního manumycinu v délce spodního řetězce. To opět potvrzuje, že geny *asuC14* a *colC14* se nijak nepodílejí na biosyntéze horního polyketidového řetězce. Zachovaná produkce asukamycinu byla u tohoto kmenu podstatně vyšší, než produkce „asukamycin-tetraenu“. Tento výsledek se úplně neshoduje s prací prováděnou paralelně u *Streptomyces* SOK1/5-4 Δ *colC11*–*C14*. U něho byla po transformaci plasmidem pASU-ASU (odpovídá pCOL-COL u producenta asukamycinu) také detekována produkce colabomycinu E a nového manumycinového antibiotika, které mělo strukturu colabomycinu E s trienovým spodním řetězcem („colabomycin-trien“), avšak v tomto případě byla produkce „colabomycin-trienu“ podstatně vyšší než produkce colabomycinu E (Petříček *et al.* – nepublikovaná data).

U připraveného mutantního kmenu *Streptomyces nodosus* ssp. *asukaensis* Δ *asuC13*–*C14* transformovaného plasmidem pASU-COL byla prokázána produkce asukamycinu i „asukamycin-tetraenu“. V tomto případě byly obě látky produkovány jen ve velmi malé míře oproti ostatním mutantním producentům. Zachovaná produkce asukamycinu byla výrazně vyšší, než produkce „asukamycin-tetraenu“. Plasmid pASU-COL nesl geny pro ACP proteiny a gen *asuC13* z přírodního producenta asukamycinu a gen pro potenciální CLF (*colC14*) z producenta colabomycinu E. Jelikož jediným genem z producenta colabomycinu E byl *colC14*, bylo tak opět potvrzeno, že přítomnost genu *colC14* je skutečně schopna vyvolat změnu délky syntetizovaného spodního polyketidového řetězce. Výsledek podporující tento závěr byl pozorován i u mutantního kmenu *Streptomyces* SOK1/5-4 Δ *colC11*–*C14*, který byl transformován plasmidem pCOL-ASU (odpovídá pASU-COL u producenta asukamycinu). U něho byla detekována produkce colabomycinu E a nového manumycinového antibiotika „colabomycin-trienu“. Stejně jako u kmenu *Streptomyces* SOK1/5-4 Δ *colC11*–*C14* transformovaného plasmidem pASU-ASU byla i zde detekována podstatně vyšší produkce „colabomycin-trienu“ než colabomycinu E. Celková produkce manumycinových antibiotik byla srovnatelná s ostatními mutantními kmeny (Petříček *et al.* – nepublikovaná data).

Znatelně snížená produkce manumycinových antibiotik u mutantních kmenů transformovaných plasmidem pASU-COL mohla být způsobena nedostatečnou expresí genu *colC14*. Gen *colC14* byl na plasmidu zařazen za gen *asuC13* a mezigenová sekvence neodpovídá tedy původní sekvenci, nacházející se v genovém shluku na chromozómu divokého kmenu producenta colabomycinu E. Tuto teorii by bylo možné v budoucnu ověřit např. provedením měření úrovně exprese genu *colC14* v mutantních kmenech.

U obou připravených kmenů produkujících „asukamycin-tetraen“ (transformované plasmidy pCOL-COL a pASU-COL) byla zachována produkce asukamycinu, která byla navíc vždy podstatně vyšší, než produkce nově připraveného „asukamycin-tetraenu“. Tím se tento výsledek liší od závěrů práce prováděné paralelně se *Streptomyces* SOK1/5-4 Δ *colC11*–*C14*. U něho byla při transformaci plasmidy pASU-ASU a pCOL-ASU vždy detekována majoritní produkce „colabomycin-tetraenu“ a pouze minoritní produkce colabomycinu E (Petříček *et al.*

– nepublikovaná data). Jelikož v chromozómu mutantu *Streptomyces nodosus* ssp. *asukaensis* Δ *asuC13–C14* byly zachovány geny pro ACP proteiny (*asuC11* a *C12*), zatímco v mutantním kmenu *Streptomyces* SOK1/5-4 Δ *colC11–C14* byly tyto geny deletovány společně s *colC13* a *C14*, předpokládáme, že úlohu v zachování vysoké produkce asukamycinu by mohly mít právě ACP proteiny. Pro objasnění podstaty tohoto jevu, bude nezbytné vytvořit mutantní kmen *Streptomyces nodosus* ssp. *asukaensis* stejným způsobem, jako v případě *Streptomyces* SOK1/5-4 Δ *colC11–C14* (s delecí kompletního operonu *asuC11–C14*) a následně u něho provést obdobnou analýzu. Dalším možným faktorem ovlivňujícím množství a poměr jednotlivých produktů by mohla být specifita amid-syntázy připojující horní řetězec ke zbytku molekuly. Její výrazná preference pro 3,4-AHBA s trienovým řetězcem namísto tetraenového by mohla též ovlivnit poměr konečných metabolitů. V tomto případě, bychom však předpokládali hromadění syntetizovaných meziproductů detekovatelné v extraktech, které nebylo prokázáno.

Vzájemné porovnání aminokyselinových sekvencí různých CLF, které bylo provedeno v této práci (Obr. 6) ukazuje, že AsuC14 se výrazně odlišuje od všech dosud popsáných CLF proteinů. Postrádá ve své aminokyselinové sekvenci konzervovaný glutamin v pozici odpovídající aktivnímu cysteinu u KS a další velké množství konzervovaných aminokyselin. Poměrně velké úseky sekvence u AsuC14 oproti ostatním CLF zcela chybějí. Jedná se tedy o novou rodinu CLF proteinů, které se patrně podílejí výhradně na biosyntéze krátkých polyketidových řetězců.

Představa o přesném fungování ACP proteinů, KS I/II a těchto CLF v biosyntetickém komplexu spodního polyketidového řetězce bude v další fázi výzkumu získána na základě výsledků experimentů *in vitro* systému. V budoucnu budou také zkoumány biologické aktivity „asukamycin-tetraenu“. Bude popsáno, jak se odlišují od aktivit asukamycinu, a jakou úlohu tedy může hrát v biologické aktivitě změna délky spodního polyketidového řetězce u manumycinových antibiotik.

6. Souhrn

- Byl připraven mutant *Streptomyces nodosus* ssp. *asukaensis* Δ *asuC13–C14* nesoucí „in-frame“ delecí v oblasti genů *asuC13–C14* na bakteriálním chromozómu.
- Připravený mutant *Streptomyces nodosus* ssp. *asukaensis* Δ *asuC13–C14* byl transformován sadou plasmidů nesoucích geny pro ACP proteiny (*C11* a *C12*) a geny *C13* a *C14* z přírodních producentů asukamycinu, manumycinu A a colabomycinu E.
- Expresí genů *asuC13* a *asuC14* (vložených na plasmidu pASU-ASU) v připraveném mutantním kmenu *Streptomyces nodosus* ssp. *asukaensis* Δ *asuC13–C14* byla ověřena funkčnost navrženého produkčního systému.
- Analýzou produkovaných manumycinových antibiotik u transformovaných mutantních kmenů bylo ověřeno, že geny *asuC13* a *asuC14* jsou funkčně nahraditelné homologními geny z producentů manumycinu A a colabomycinu E.
- Analýzou produkovaných manumycinových antibiotik u transformovaných mutantních kmenů bylo ověřeno, že přítomnost genu *C14* je esenciální pro produkci manumycinových antibiotik.
- Analýzou produkovaných manumycinových antibiotik u transformovaných mutantních kmenů bylo ověřeno, že produkt genu *C14* je zodpovědný za regulaci délky syntetizovaného spodního polyketidového řetězce a jedná se tedy o druh CLF.
- Při porovnání aminokyselinových sekvencí známých CLF proteinů a AsuC14 bylo ukázáno, že AsuC14 se výrazně odlišuje od dosud popsaných CLF. Jedná se o zcela nový typ CLF proteinu, který se podílí patrně výhradně na biosyntéze krátkých polyketidových řetězců (o délce řetězce kratší, než 12 atomů uhlíku).
- U mutantních kmenů transformovaných plasmidy pCOL-COL a pASU-COL byla prokázána produkce nového manumycinového antibiotika, které nese stejný horní polyketidový řetězec jako asukamycin a tetraenový spodní řetězec („asukamycin-tetraen“).

7. Seznam použité literatury

- Alcaraz L, Macdonald G, Kapfer I, Lewis NJ & Taylor RJK (1996): The first total synthesis of a member of the manumycin family of antibiotics: Alisamycin. *Tetrahedron Letters* **37**: 6619-6622.
- Alcaraz L, Macdonald G, Ragot J, Lewis NJ & Taylor RJK (1999): Synthetic approaches to the Manumycin A, B and C antibiotics: The first total synthesis of (+)-Manumycin A. *Tetrahedron* **55**: 3707-3716.
- Austin MB & Noel JP (2003): The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases. *Nat Prod Rep* **20**: 79-110.
- Bentley SD, Chater KF, Cerdeno-Tarraga AM, *et al.* (2002): Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* **417**: 141-147.
- Bernier M, Kwon YK, Pandey SK, *et al.* (2006): Binding of manumycin A inhibits IkappaB kinase beta activity. *J Biol Chem* **281**: 2551-2561.
- Bibb MJ, Janssen GR & Ward JM (1985): Cloning and analysis of the promoter region of the erythromycin resistance gene (*ermE*) of *Streptomyces erythraeus*. *Gene* **38**: 215-226.
- Bibb MJ, Sherman DH, Omura S & Hopwood DA (1994): Cloning, sequencing and deduced functions of a cluster of *Streptomyces* genes probably encoding biosynthesis of the polyketide antibiotic frenolicin. *Gene* **142**: 31-39.
- Bibb MJ, Biro S, Motamedi H, Collins JF & Hutchinson CR (1989): Analysis of the nucleotide sequence of the *Streptomyces glaucescens tcmI* genes provides key information about the enzymology of polyketide antibiotic biosynthesis. *EMBO J* **8**: 2727-2736.
- Brodasky TF, Stroman DW, Dietz A & Mizens S (1983): U-56,407, a new antibiotic related to asukamycin: isolation and characterization. *J Antibiot (Tokyo)* **36**: 950-956.
- Bullock WD, Fernandes JM & Short JM (1987): XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques* **5**: 376-379
- Burson KK & Khosla C (2000): Dissecting the chain length specificity in bacterial aromatic polyketide synthases using chimeric genes. *Tetrahedron* **56**: 9401-9408.
- Buzzetti F, Gaeumann E, Huetter R, Keller-Schierlein W, Neipp L, Prelog V & Zaehner H (1963): [Metabolites of microorganisms. 41. Manumycin]. *Pharm Acta Helv* **38**: 871-874.
- Carreras CW & Khosla C (1998): Purification and in vitro reconstitution of the essential protein components of an aromatic polyketide synthase. *Biochemistry* **37**: 2084-2088.
- Costantini C, Weindruch R, Della Valle G & Puglielli L (2005): A TrkA-to-p75NTR molecular switch activates amyloid beta-peptide generation during aging. *Biochem J* **391**: 59-67.

Dary A, Martin P, Wenner T, Decaris B & Leblond P (2000): DNA rearrangements at the extremities of the *Streptomyces ambofaciens* linear chromosome: evidence for developmental control. *Biochimie* **82**: 29-34.

Donadio S, Staver MJ, McAlpine JB, Swanson SJ & Katz L (1991): Modular organization of genes required for complex polyketide biosynthesis. *Science* **252**: 675-679.

Downward J (2003): Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **3**: 11-22.

Dreier J & Khosla C (2000): Mechanistic analysis of a type II polyketide synthase. Role of conserved residues in the beta-ketoacyl synthase-chain length factor heterodimer. *Biochemistry* **39**: 2088-2095.

Finegold AA, Schafer WR, Rine J, Whiteway M & Tamanoi F (1990): Common modifications of trimeric G proteins and ras protein: involvement of polyisoprenylation. *Science* **249**: 165-169.

Flores-Sanchez IJ & Verpoorte R (2009): Plant polyketide synthases: a fascinating group of enzymes. *Plant Physiol Biochem* **47**: 167-174.

Franco CM, Maurya R, Vijayakumar EK, Chatterjee S, Blumbach J & Ganguli BN (1991): Alisamycin, a new antibiotic of the manumycin group. I. Taxonomy, production, isolation and biological activity. *J Antibiot (Tokyo)* **44**: 1289-1293.

Gibbs JB, Oliff A & Kohl NE (1994): Farnesyltransferase inhibitors: Ras research yields a potential cancer therapeutic. *Cell* **77**: 175-178.

Goodman LE, Judd SR, Farnsworth CC, Powers S, Gelb MH, Glomset JA & Tamanoi F (1990): Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* defective in the farnesylation of Ras proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 9665-9669.

Gould SJ, Melville CR & Cone MC (1996): 3-Amino-4-hydroxybenzoic acid is derived from the tricarboxylic acid cycle rather than the shikimic acid pathway¹. *Journal of the American Chemical Society* **118**: 9228-9232.

Grote R, Zeeck A & Beale JM, Jr. (1988a): Metabolic products of microorganisms. 245. Colabomycins, new antibiotics of the manumycin group from *Streptomyces griseoflavus*. II. Structure of colabomycin A. *J Antibiot (Tokyo)* **41**: 1186-1195.

Grote R, Zeeck A, Drautz H & Zahner H (1988b): Metabolic products of microorganisms. 244. Colabomycins, new antibiotics of the manumycin group from *Streptomyces griseoflavus*. I. Isolation, characterization and biological properties. *J Antibiot (Tokyo)* **41**: 1178-1185.

Hara M, Akasaka K, Akinaga S, *et al.* (1993): Identification of Ras farnesyltransferase inhibitors by microbial screening. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 2281-2285.

Hayashi K, Nakagawa M, Fujita T, Tanimori S & Nakayama M (1993): Nisamycin, a new manumycin group antibiotic from *Streptomyces* K106. *J Antibiot (Tokyo)* **46**: 1904-1907.

- Hori Y, Abe Y, Ezaki M, Goto T, Okuhara M & Kohsaka M (1993): R1128 substances, novel non-steroidal estrogen-receptor antagonists produced by a *Streptomyces*. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological properties. *J Antibiot (Tokyo)* **46**: 1055-1062.
- Hu Y & Floss HG (2006): Starter unit specificity of the asukamycin "upper" chain polyketide synthase and the branched-chain fatty acid synthase of *Streptomyces nodosus* subsp. *asukaensis*. *Heterocycles* **69**: 133-149.
- Choulet F, Aigle B, Gallois A, *et al.* (2006): Evolution of the terminal regions of the *Streptomyces* linear chromosome. *Mol Biol Evol* **23**: 2361-2369.
- Ikeda H, Ishikawa J, Hanamoto A, *et al.* (2003): Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nat Biotechnol* **21**: 526-531.
- Ito T, Kawata S, Tamura S, *et al.* (1996): Suppression of human pancreatic cancer growth in BALB/c nude mice by manumycin, a farnesyl:protein transferase inhibitor. *Jpn J Cancer Res* **87**: 113-116.
- Kainuma O, Asano T, Hasegawa M, Kenmochi T, Nakagohri T, Tokoro Y & Isono K (1997): Inhibition of growth and invasive activity of human pancreatic cancer cells by a farnesyltransferase inhibitor, manumycin. *Pancreas* **15**: 379-383.
- Kapfer I, Lewis NJ, Macdonald G & Taylor RJK (1996): The synthesis of novel analogues of the manumycin family of antibiotics and the antitumour antibiotic LL-C10037alpha. *Tetrahedron Letters* **37**: 2101-2104.
- Katsuyama Y & Ohnishi Y (2012): Type III polyketide synthases in microorganisms. *Methods Enzymol* **515**: 359-377.
- Katz E, Thompson CJ & Hopwood DA (1983): Cloning and expression of the tyrosinase gene from *Streptomyces antibioticus* in *Streptomyces lividans*. *J Gen Microbiol* **129**: 2703-2714.
- Keatinge-Clay AT, Maltby DA, Medzihradzky KF, Khosla C & Stroud RM (2004): An antibiotic factory caught in action. *Nat Struct Mol Biol* **11**: 888-893.
- Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, Chater KF & Hopwood DA (2000): Practical *Streptomyces* genetics. The John Innes Foundation, Norwich.
- Kohno J, Nishio M, Kawano K, Nakanishi N, Suzuki S, Uchida T & Komatsubara S (1996): TMC-1 A, B, C and D, new antibiotics of the manumycin group produced by *Streptomyces*. Taxonomy, production, isolation, physico-chemical properties, structure elucidation and biological properties. *J Antibiot (Tokyo)* **49**: 1212-1220.
- Kolattukudy PE, Fernandes ND, Azad AK, Fitzmaurice AM & Sirakova TD (1997): Biochemistry and molecular genetics of cell-wall lipid biosynthesis in mycobacteria. *Mol Microbiol* **24**: 263-270.

- Li F, Maskey RP, Qin S, *et al.* (2005): Chinikomycins A and B: isolation, structure elucidation, and biological activity of novel antibiotics from a marine *Streptomyces* sp. isolate M045. *J Nat Prod* **68**: 349-353.
- Liou GF & Khosla C (2003): Building-block selectivity of polyketide synthases. *Curr Opin Chem Biol* **7**: 279-284.
- Malpartida F & Hopwood DA (1986): Physical and genetic characterisation of the gene cluster for the antibiotic actinorhodin in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Gen Genet* **205**: 66-73.
- Marti T, Hu Z, Pohl NL, Shah AN & Khosla C (2000): Cloning, nucleotide sequence, and heterologous expression of the biosynthetic gene cluster for R1128, a non-steroidal estrogen receptor antagonist. Insights into an unusual priming mechanism. *J Biol Chem* **275**: 33443-33448.
- McDaniel R, Ebert-Khosla S, Hopwood DA & Khosla C (1993): Engineered biosynthesis of novel polyketides. *Science* **262**: 1546-1550.
- McDaniel R, Ebert-Khosla S, Fu H, Hopwood DA & Khosla C (1994): Engineered biosynthesis of novel polyketides: influence of a downstream enzyme on the catalytic specificity of a minimal aromatic polyketide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 11542-11546.
- Mead DA, Szczesna-Skorupa E & Kemper B (1986): Single-stranded DNA 'blue' T7 promoter plasmids: a versatile tandem promoter system for cloning and protein engineering. *Protein Eng* **1**: 67-74.
- Motamedi H & Hutchinson CR (1987): Cloning and heterologous expression of a gene cluster for the biosynthesis of tetracenomycin C, the anthracycline antitumor antibiotic of *Streptomyces glaucescens*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 4445-4449.
- Muller R (2004): Don't classify polyketide synthases. *Chem Biol* **11**: 4-6.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G & Erlich H (1986): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1**: 263-273.
- Muth G, Nußbaumer B, Wohlleben W & Pühler A (1989): A vector system with temperature-sensitive replication for gene disruption and mutational cloning in streptomycetes. *Molecular and General Genetics MGG* **219**: 341-348.
- Ohnishi Y, Seo JW & Horinouchi S (2002): Deprogrammed sporulation in *Streptomyces*. *FEMS Microbiol Lett* **216**: 1-7.
- Ohnishi Y, Ishikawa J, Hara H, *et al.* (2008): Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. *J Bacteriol* **190**: 4050-4060.
- Omura S, Kitao C, Tanaka H, Oiwa R & Takahashi Y (1976): A new antibiotic,, asukamycin, produced by *Streptomyces*. *J Antibiot (Tokyo)* **29**: 876-881.

- Ostash B, Saghatelian A & Walker S (2007): A streamlined metabolic pathway for the biosynthesis of moenomycin A. *Chem Biol* **14**: 257-267.
- Palmer BR & Marinus MG (1994): The *dam* and *dcm* strains of *Escherichia coli*--a review. *Gene* **143**: 1-12.
- Pan J, Huang H, Sun L, Fang B & Yeung SC (2005): Bcl-2-associated X protein is the main mediator of manumycin a-induced apoptosis in anaplastic thyroid cancer cells. *J Clin Endocrinol Metab* **90**: 3583-3591.
- Petricek M, Petrickova K, Havlicek L & Felsberg J (2006): Occurrence of two 5-aminolevulinate biosynthetic pathways in *Streptomyces nodosus* subsp. *asukaensis* is linked with the production of asukamycin. *J Bacteriol* **188**: 5113-5123.
- Pospisil S, Petrickova K, Sedmera P, Halada P, Olsovská J & Petricek M (2011): Effect of starter unit availability on the spectrum of manumycin-type metabolites produced by *Streptomyces nodosus* ssp. *asukaensis*. *J Appl Microbiol* **111**: 1116-1128.
- Rock CO & Jackowski S (2002): Forty years of bacterial fatty acid synthesis. *Biochem Biophys Res Commun* **292**: 1155-1166.
- Rui Z, Petrickova K, Skanta F, *et al.* (2010): Biochemical and genetic insights into asukamycin biosynthesis. *J Biol Chem* **285**: 24915-24924.
- Sackova V, Kulikova L, Kello M, Uhrinova I & Fedorocko P (2011): Enhanced antiproliferative and apoptotic response of HT-29 adenocarcinoma cells to combination of photoactivated hypericin and farnesyltransferase inhibitor manumycin A. *Int J Mol Sci* **12**: 8388-8405.
- Sambrook J & Russell DW (2001): Molecular cloning: A laboratory manual. CSHL Press, New York.
- Sattler I, Groene C & Zeeck A (1993): New compounds of the manumycin group of antibiotics and a facilitated route for their structure elucidation. *The Journal of Organic Chemistry* **58**: 6583-6587.
- Sattler I, Thiericke R & Zeeck A (1998): The manumycin-group metabolites. *Nat Prod Rep* **15**: 221-240.
- Sears KT, Daino H & Carey GB (2008): Reactive oxygen species-dependent destruction of MEK and Akt in Manumycin stimulated death of lymphoid tumor and myeloma cell lines. *Int J Cancer* **122**: 1496-1505.
- Shu YZ, Huang S, Wang RR, *et al.* (1994): Manumycins E, F and G, new members of manumycin class antibiotics, from *Streptomyces* sp. *J Antibiot (Tokyo)* **47**: 324-333.
- Slechta L, Cialdella JI, Mizesak SA & Hoeksema H (1982): Isolation and characterization of a new antibiotic U-62162. *J Antibiot (Tokyo)* **35**: 556-560.

- Staunton J & Weissman KJ (2001): Polyketide biosynthesis: a millennium review. *Nat Prod Rep* **18**: 380-416.
- Striz I, Krasna E, Petrickova K, *et al.* (2008): Manumycin and asukamycin inhibition of IL-1beta and IL-18 release from human macrophages by caspase-1 blocking. *Allergy* 142-143.
- Szu PH, Govindarajan S, Meehan MJ, *et al.* (2011): Analysis of the ketosynthase-chain length factor heterodimer from the fredericamycin polyketide synthase. *Chem Biol* **18**: 1021-1031.
- Tanaka T, Tsukuda E, Uosaki Y & Matsuda Y (1996): EI-1511-3, -5 and EI-1625-2, novel interleukin-1 beta converting enzyme inhibitors produced by *Streptomyces* sp. E-1511 and E-1625. III. Biochemical properties of EI-1511-3, -5 and EI-1625-2. *J Antibiot (Tokyo)* **49**: 1085-1090.
- Tang Y, Tsai SC & Khosla C (2003a): Polyketide chain length control by chain length factor. *J Am Chem Soc* **125**: 12708-12709.
- Tang Y, Lee TS & Khosla C (2004): Engineered biosynthesis of regioselectively modified aromatic polyketides using bimodular polyketide synthases. *PLoS Biol* **2**: E31.
- Tang Y, Lee TS, Kobayashi S & Khosla C (2003b): Ketosynthases in the initiation and elongation modules of aromatic polyketide synthases have orthogonal acyl carrier protein specificity. *Biochemistry* **42**: 6588-6595.
- Thiericke R, Zeeck A, Robinson JA, Beale JM & Floss HG (1989): The biosynthesis of manumycin; origin of the oxygen and nitrogen atoms. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **0**: 402-403.
- Thiericke R, Zeeck A, Nakagawa A, *et al.* (1990): Biosynthesis of the manumycin group antibiotics. *Journal of the American Chemical Society* **112**: 3979-3987.
- Vogelstein B & Gillespie D (1979): Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**: 615-619.
- Walsh CT, Gehring AM, Weinreb PH, Quadri LE & Flugel RS (1997): Post-translational modification of polyketide and nonribosomal peptide synthases. *Curr Opin Chem Biol* **1**: 309-315.
- Wei X, J. Cronje Grove J & J. K. Taylor R (1999): The first total synthesis of (+/-)-colabomycin D. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions I* **0**: 1143-1146.
- Weissman KJ (2009): Introduction to polyketide biosynthesis. *Methods Enzymol* **459**: 3-16.
- Wendt-Pienkowski E, Huang Y, Zhang J, *et al.* (2005): Cloning, sequencing, analysis, and heterologous expression of the fredericamycin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces griseus*. *J Am Chem Soc* **127**: 16442-16452.
- Wright LF & Hopwood DA (1976): Actinorhodin is a chromosomally-determined antibiotic in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Gen Microbiol* **96**: 289-297.

- Xie P, Sheng Y, Ito T & Mahmud T (2012): Transcriptional regulation and increased production of asukamycin in engineered *Streptomyces nodosus* subsp. *asukaensis* strains. *Appl Microbiol Biotechnol* **96**: 451-460.
- Xu Z, Schenk A & Hertweck C (2007): Molecular analysis of the benastatin biosynthetic pathway and genetic engineering of altered fatty acid-polyketide hybrids. *J Am Chem Soc* **129**: 6022-6030.
- Xu Z, Metsa-Ketela M & Hertweck C (2009): Ketosynthase III as a gateway to engineering the biosynthesis of antitumoral benastatin derivatives. *J Biotechnol* **140**: 107-113.
- Yeung SC, She M, Yang H, Pan J, Sun L & Chaplin D (2007): Combination chemotherapy including combretastatin A4 phosphate and paclitaxel is effective against anaplastic thyroid cancer in a nude mouse xenograft model. *J Clin Endocrinol Metab* **92**: 2902-2909.
- Zeeck A, Schroder K, Frobel K, Grote R & Thiericke R (1987): The structure of manumycin. I. Characterization, structure elucidation and biological activity. *J Antibiot (Tokyo)* **40**: 1530-1540.
- Zhang W, Bolla ML, Kahne D & Walsh CT (2010): A three enzyme pathway for 2-amino-3-hydroxycyclopent-2-enone formation and incorporation in natural product biosynthesis. *J Am Chem Soc* **132**: 6402-6411.
- Zheng ZH, Dong YS, Zhang H, *et al.* (2007): Isolation and characterization of N98-1272 A, B and C, selective acetylcholinesterase inhibitors from metabolites of an actinomycete strain. *J Enzyme Inhib Med Chem* **22**: 43-49.
- Zhu G, LaGier MJ, Stejskal F, Millership JJ, Cai X & Keithly JS (2002): *Cryptosporidium parvum*: the first protist known to encode a putative polyketide synthase. *Gene* **298**: 79-89.